

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

**Influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades cristalográficas,
composicionales y morfológicas de la hidroxiapatita natural obtenida a partir de
hueso ovino**

Valentina Restrepo Ramirez

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad de Ingenierías

Programa de Ingeniería Física

Pereira, Colombia

2020

**Influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades cristalográficas,
composicionales y morfológicas de la hidroxiapatita natural obtenida a partir de
hueso ovino**

Valentina Restrepo Ramirez

Tesis presentada como requisito para recibir el título de

Ingeniera Física

Director:

M. Sc. Iván Darío Arellano Ramírez

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad de Ingenierías

Programa de Ingeniería Física

Pereira, Colombia

2020

Agradecimientos

A la Universidad Tecnológica de Pereira, por ser mi segundo hogar.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, por ser la institución que me permitió llevar a cabo mi investigación.

Al magíster Iván Darío Arellano Ramírez, por ser un apoyo personal y profesional en todo este proceso.

Al Grupo de Investigación en Modelado y Simulación Computacional – GIMOSIC, por permitirme pertenecer a él en la Universidad Tecnológica de Pereira.

Al Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, en cabeza de la profesora Elisabeth Restrepo Parra, por acogerme en su grupo de trabajo.

A la ingeniera física Natalia Alzate Acevedo, por su amistad y apoyo en el desarrollo de este.

A mis padres y hermanas, por su amor y confianza.

Al profesional Mateo Castro Ruiz, por su compañía y apoyo.

A mis amigos y compañeros de estudio, por ayudarme a superar los retos que se me presentaron.

Resumen

En este trabajo se realizó el estudio de la influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades cristalográficas, composicionales y morfológicas de la hidroxiapatita natural obtenida a partir del hueso de ovino. El trabajo se dividió en dos partes: la obtención de la hidroxiapatita y la caracterización de las muestras una vez son sometidas a las temperaturas de calcinación; en la primera se realizó la cocción de los huesos para retirar el material orgánico superficial, lavado, someter a radiación de microondas, molienda y, posteriormente, calcinación de las muestras obtenidas a temperaturas de 600°C, 800°C y 1000°C. Seguido al proceso de molienda, una muestra de polvo de hueso fue evaluada mediante análisis termogravimétrico (TGA). En la segunda parte, las muestras resultantes de los procesos de calcinación fueron caracterizadas utilizando difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y microscopia electrónica de barrido con análisis elemental (MEB-EDS) con el propósito de obtener información estructural, composicional y morfológica. En la curva termogravimétrica se identificaron las temperaturas de descomposición de las fases orgánicas presentes en el polvo de hueso ovino. En los análisis de difracción de rayos X se encontró que los patrones de difracción presentan picos característicos de la hidroxiapatita y que el incremento de la temperatura favorece el crecimiento del cristal y su tamaño. Así mismo, en el análisis morfológico se comprueban dichos cambios en las muestras, encontrando mayor aglomeración de las partículas, mientras que los análisis EDS revelaron las diferentes relaciones Ca/P para las temperaturas de calcinación empleadas. En los espectros FT-IR, se observaron las bandas vibracionales características de los grupos funcionales fosfato e hidroxilo presentes en las muestras, también, gracias a las temperaturas desaparecieron las bandas vibracionales correspondientes al agua y las proteínas y, disminuyeron las bandas de los carbonatos.

Palabras clave: Difracción de rayos X, FT-IR, hidroxiapatita, hueso ovino, microscopia electrónica de barrido, temperatura de calcinación, termogravimetría.

Los resultados de la tesis han sido mostrados en los siguientes eventos

Influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades cristalográficas, composicionales y morfológicas de la hidroxiapatita natural obtenida a partir de hueso fémur ovino

XXVIII Congreso Nacional de Física

Armenia (9 al 12 de septiembre de 2019)



Influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades cristalográficas, composicionales y morfológicas de la hidroxiapatita natural obtenida a partir de hueso ovino

En base a la presente tesis hay un artículo que se encuentra en revisión.

El artículo fue enviado a la revista Inorganics, la cual según el SJR se encuentra en el cuartil 2.

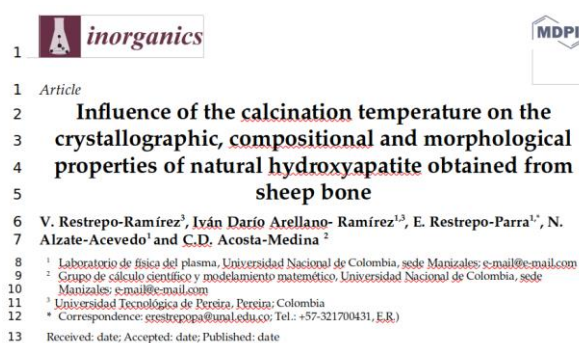
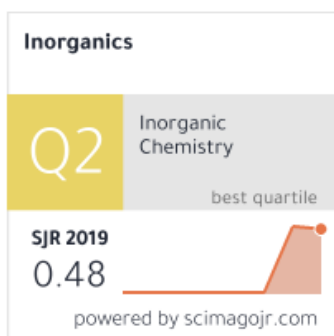


Tabla de contenido

1. Capítulo 1:	7
1.1 Introducción	7
1.2 Pregunta de Investigación	10
1.3 Justificación	11
1.4 Objetivos	12
1.4.1 Objetivo General	12
1.4.2 Objetivos Específicos	12
2. Capítulo 2: Marco teórico y Estado del Arte	13
2.1 Estado del Arte	13
2.2 Marco teórico	14
2.2.1 Biomateriales	14
2.1.1.1 Hueso	17
2.2.2 Hidroxiapatita	18
2.2.3 Métodos de caracterización	23
2.2.2 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)	28
3. Capítulo 3: Metodología	33
4. Capítulo 4: Análisis de Resultados	37
4.1 Microscopia electrónica de Barrido MEB	37
4.2 Energía Dispersiva de Rayos X	38
4.3 Análisis termogravimétrico y Primera derivada	39
4.4 Difracción de rayos X	40
4.5 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier FT-IR	42
5. Capítulo 5: Conclusiones	44

Capítulo 1:

1.1 Introducción

En los últimos 50 años, la diversidad de avances e innovación en materiales utilizados en medicina y biotecnología, son testimonio de los importantes progresos científicos y tecnológicos, que responden a las necesidades de los seres humanos ocasionadas principalmente por el envejecimiento de la población y por la aparición de enfermedades óseas [1], [2]. Uno de los materiales estudiados para interactuar con los sistemas biológicos es la hidroxiapatita (HAp), cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, esta cerámica presenta una estructura hexagonal con el grupo espacial P63/m [3], [4]. Ha sido demostrado a través de experimentos que la HAp presenta características bioactivas, biocompatibles, bioestables y osteoconductoras [4], [5]. Además, ha incursionado en la biomedicina como un material restaurador, utilizado en la oftalmología, odontología y ortopedia [6], [7]. En esta última se han encontrado resultados favorables para la bio hidroxiapatita, cuyo precursor es natural, y está presente en los huesos bovinos, porcinos y humanos, entre otros [4].

De igual manera, la HAp se encuentra en rocas minerales, y se puede obtener por síntesis de ciertos componentes químicos [8], mediante métodos como: sol-gel, hidrotérmicos, sonoquímicos, y el uso de precursores a partir de cáscaras de huevos y corales [9]. Una de las principales ventajas de la bio hidroxiapatita es que se puede sintetizar en grandes cantidades a partir de biorresiduos producidos por huesos de ganado, lo que convierte esta fuente en un método ecológico. Sin embargo, algunos tipos de síntesis pueden presentar desventajas por la ausencia de propiedades osteoconductoras y mecánicas [10].

Dentro de los procesos de síntesis de la bio hidroxiapatita están el desengrasado, tratamiento alcalino y calcinación [11]. Esta última de particular importancia pues remueve la materia orgánica que en otros procesos no ha sido removida, por esta razón se han hecho análisis de la influencia de la temperatura en las propiedades estructurales, morfológicas y vibratorias de la HAp obtenida a partir de hueso de mamíferos, donde se ha encontrado aumento del grado de cristalinidad y tamaño del cristal con la temperatura, contrario a lo que ocurre con la porosidad. Así mismo, se ha hallado con escaneo calorimétrico diferencial y análisis termogravimétrico que para $T > 700^\circ\text{C}$ no hay

componentes orgánicos en la matriz y que para $T > 800^{\circ}\text{C}$ se presenta una transición de orden-desorden [12], [13].

Igualmente, se han realizado estudios comparativos de la calidad de la bio hidroxiapatita obtenida a partir de hueso de bobino con la de origen comercial [11]; así como también el crecimiento de los cristales de HAp durante el proceso de calcinación debido al fenómeno de coalescencia para temperaturas superiores a 700°C , y la forma en que la razón molar Ca/P decrece para muestras que se calcinan a temperaturas superiores de 900°C [14]. En esta misma línea se ha encontrado estrechamiento en los picos de difracción de rayos X debido al crecimiento cristalino en temperaturas de calcinación de aproximadamente 700°C , confirmando que el crecimiento cristalino es un proceso que inicia cuando la muestra tiene pérdida de materia orgánica y se da el cambio de la bio-hidroxiapatita de nano a microescala [15].

En consecuencia, las técnicas y métodos instrumentales usados para la caracterización de biomateriales y tejidos óseos son vitales para su estudio, estos se pueden dividir según la propiedad que se desea estudiar, por ejemplo, cristalinidad, tamaño de partícula, análisis químico y estructural y morfología, con técnicas particulares en cada una de estas clasificaciones [16], todas relevantes para hacer un análisis de la HAp obtenida. Agregando a lo anterior, el análisis termogravimétrico y el escaneo calorimétrico diferencial brindan importante información sobre las propiedades y fases de transición cuando se expone una muestra a calentamiento [17].

Es importante reconocer los componentes de las fuentes naturales de HAp para identificar que aplicaciones biomédicas en prótesis o reemplazo parcial de hueso se podrían realizar [17-19]. Por esta razón en algunos trabajos se ha estudiado la estabilidad del hueso humano y la extracción del colágeno tipo I, encontrándose que la mineralización produce un cambio en las propiedades químicas y mecánicas del colágeno del tejido óseo, reduciendo con ello la elasticidad y resistencia de este [7], [21].

Ahora bien, en la revisión bibliográfica se han encontrado pocos estudios con fuente ovina como materia prima para la producción de hidroxiapatita [22], [23], en relación con los de otras fuentes animales; por consiguiente, la intención de este trabajo es el estudio de las propiedades composicionales, morfológicas y cristalográficas al variar la temperatura de calcinación y, analizar cómo estas modificaciones intervienen en la razón Ca/P, factor importante en la posible biocompatibilidad de la HAp obtenida a partir de hueso de ovino. Además, el material óseo fue extraído de un matadero ubicado en

Marulanda, Caldas, donde se busca realizar una transmisión del conocimiento a las personas de esta comunidad sobre la preparación de esta fuente de bio HAp y aprovechar los desperdicios orgánicos de este lugar.

Para llevar a cabo este estudio se sintetiza el polvo de hueso fémur de ovino de un espécimen macho de aproximadamente dos años y se caracteriza por medio de análisis termogravimétrico (TGA), microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS), difracción de rayos-X (XRD) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Encontrándose en el análisis de XRD picos característicos de la HAp, con FTIR se encontraron bandas vibracionales propias de los grupos funcionales fosfato e hidroxilo.

1.2 Pregunta de Investigación

El desarrollo de materiales con fines médicos ha venido en apogeo dando paso a avances en la obtención de materiales cerámicos que permiten la reconstrucción y reparación del sistema óseo y recubrimientos dentales, por lo cual los fosfatos de calcio han sido vistos como una opción viable para ser parte de los biomateriales. Es aquí donde la hidroxiapatita (HAp) de origen natural obtenida a partir de huesos de animales ha cobrado importancia [5]. Además, existe una necesidad en la obtención de materiales que sean biocompatibles para la implementación de prótesis y regeneración óseas en pacientes que han sufrido accidentes o determinadas patologías, y, en respuesta a esta necesidad aparece la hidroxiapatita al poseer excelentes propiedades de biocompatibilidad y osteoconductividad.

Las investigaciones alrededor de la obtención de hidroxiapatita a partir de diversas fuentes no se han dado a esperar y, una las más sustentables es la de origen animal, donde gracias a procesos de síntesis generalmente vinculados a tratamientos térmicos, es posible obtener hidroxiapatita. Sin embargo, los estudios de HAp a partir de hueso ovino son relativamente pocos en comparación con los de otras especies animales, y este también representan una fuente de bajo costo para su producción, por lo cual, es prudente realizar una investigación a cerca de la forma en que interviene la variación de la temperatura de calcinación en la obtención de este biomaterial usando como materia prima el hueso ovino, ya que al variar la fuente es posible que cambien las propiedades de composición química, especialmente la relación calcio fósforo, y también las propiedades morfológicas del material, siendo estas características determinantes en la aplicabilidad de la hidroxiapatita [16].

Con base a los planteamientos anteriores se propone la pregunta de investigación:

¿Cómo interviene la temperatura de calcinación en la composición y la morfología de la hidroxiapatita obtenida a partir del hueso ovino?

1.3 Justificación

Las cerámicas son compuestos inorgánicos altamente empaquetados, que han sido usadas en implantes, recubrimiento óseo y dental. Desde hace aproximadamente medio siglo ha venido presentándose un avance en el desarrollo de materiales con aplicaciones médicas, lo que ha permitido la implementación de materiales cerámicos para la reparación y reconstrucción ósea, debido a su alta compatibilidad con estas estructuras. Los fosfatos de calcio son materiales cerámicos que, como su nombre lo indica son compuestos por grupos de fosfatos y calcio, donde específicamente la relación Ca/P habla de las propiedades biocompatibles del material. Precisamente el fosfato de calcio hidroxiapatita posee una relación de 1.67, lo cual la clasifica como un material altamente biocompatible [10].

Existen varios métodos de obtención para la hidroxiapatita, dentro de ellos están los de origen natural, extraídos de huesos animales o transformación mineral, por otro lado, están los que usan precursores químicos para su fabricación. Dentro de estos métodos uno de los menos costosos, de fácil implementación y con menos resultados nocivos para el medio ambiente es el de obtener la HAp a partir de huesos animales [5].

Los estudios de la hidroxiapatita a partir de hueso ovino han sido relativamente pocos, es por esta razón que este estudio busca realizar una caracterización de la HAp a partir del hueso de estos animales, realizando variación específicamente en la temperatura para obtener este biomaterial. Además, apelando a contribuir con la salud no solo de los seres humanos sino también del planeta, se usará como materia prima huesos que provienen de un matadero ubicado en el municipio de Marulanda en el departamento de Caldas, los cuales serían son arrojados como desperdicios al medio, generando malos olores y contaminación. Así mismo, cabe resaltar que esta investigación es en alianza con un proyecto de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, que además de hacer un aporte al conocimiento, busca contribuir ambiental y socialmente al entorno y a los campesinos vinculados con este matadero, para que en un futuro puedan beneficiarse al preparar y posteriormente comercializar la materia prima para la fabricación de hidroxiapatita.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar cómo interviene la temperatura de calcinación en la composición y morfología de la hidroxiapatita obtenida a partir de hueso de ovino.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar polvo de fosfato de calcio a partir de huesos de ovino.
2. Analizar los cambios en las propiedades cristalinas, composicionales y la relación Ca/P al someter las muestras a temperaturas de 600°C, 800°C y 1000°C.
3. Caracterizar las muestras mediante las técnicas de difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), energía dispersiva de rayos X (EDS) y espectroscopía infrarroja por transformada Fourier (FTIR) para reconocer los cambios en las propiedades cristalinas, morfológicas, relación Ca/P y composicionales.

Capítulo 2: Marco teórico y Estado del Arte

2.1 Estado del Arte

Desde principios de 1980, los fosfatos de calcio han sido empleados como revestimientos porosos en diferentes implantes metálicos para ortopedia y aplicaciones maxilofaciales, existen variadas técnicas de revestimiento como deposición electroquímica, deposición laser, nanorevestimiento por sol- gel, entre otros [24]. Además, se han investigado la HAp para el uso en la industria de drogas como portados de células para la ingeniería de tejidos y de ADN para terapias genéticas [25]–[27].

Diversos estudios se han llevado a cabo para el estudio de la hidroxiapatita, varios de ellos evaluando la influencia de la temperatura de calcinación en las propiedades de este mineral cuando proviene de fuentes biogénicas como lo son los huesos [28], [29], tomando valores como 600°C, 800°C y 1200°C [10], [12], [15], [30], por estar estos dentro del rango de cambios considerables en la obtención de la cerámica. Del mismo modo, se ha analizado la tasa de calentamiento y enfriamiento para llegar a las temperaturas de calcinación deseadas [31], u observándose las pérdidas de masa [17]. También, se ha realizado comparación entre la hidroxiapatita a partir de diferentes fuentes, como bio y la comercial [11], [32], donde la bio puede estar representada por muestras a partir de huesos bovinos, porcinos, humanos, de peces [33], obtenida por astas de ciervos [30], entre otros orígenes.

Cabe destacar que en algunos estudios la materia prima para la obtención de HAp no es de origen animal, sin embargo, el control de la temperatura es una de las variables a considerar [34], [35], [36]. Por ejemplo, en la precipitación química a partir de compuestos sintéticos, que es una de las técnicas empleadas para la obtención de HAp [37], [38], [39], la temperatura es tomada en cuenta.

En relación con estudios sobre HAp obtenida a partir de ovino, se ha encontrado un trabajo relativo a la deposición por láser pulsado de HAp sobre Ti para la obtención de películas, en mira de aplicaciones médicas en lugares sometidos a carga [23], por otro lado, otro estudio analiza la dentina ovina como fuente en la producción de esta cerámica a partir de origen bioactivo, encontrándola prometedora [22]. Ahora bien, se ha utilizado

HAp para la reconstrucción de tejidos óseos de ovinos, obteniendo que gracias a esta cerámica el crecimiento del tejido es más rápido y hay buena adherencia sobre este [40].

Sumado a lo anterior, se ha demostrado que la adición de silicio a la HAp mejora la velocidad de reparación [41], [42] ósea, por ello se han sintetizado recubrimientos finos de HAp sustituidos con Si sobre sustratos de titanio [43] por deposición, asimismo, la producción de HAp por precipitación para posteriormente realizar inmovilización sobre silicio poroso [44], también, se han producido partículas de HAp sustituidas con Si utilizando un precursor de silicio alternativo que desencadena la incorporación de este en la cadena de la HAp en un sistema de solución acuosa en condiciones hidrotermales [45], encontrándose características para el crecimiento óseo.

Otro de los elementos que ha sido usado para mejorar las propiedades de la HAp es el zinc [46], [47], el cual se sabe que aumenta la formación del hueso por parte de los osteoblastos. Los anteriores ejemplos son muestra de las posibles sustituciones de iones en la HA en busca de hacerla aún más cercana al mineral óseo.

Se han realizado numerosas aplicaciones de los CaP en los tejidos vivos, uno de los primeros documentados es el realizado Albee y Morrison en 1920, también, se inyectado partículas de este compuesto en animales, se implantó HAp en ratas en 1951 [48]. En humanos uno de los dispositivos realizados a partir de HAp fue un tornillo para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA), demostrándose que pueden soportar fuerza de tracción similar a los tornillos comerciales [21], también se ha analizado la aplicación de HAp en el cráneo después de cirugías en la zona para la reconstrucción del tejido [49]. Por su parte, el caparazón de cangrejo ha sido utilizado para producción de hidroxiapatita en búsqueda de la protección contra la desmineralización dental [50].

2.2 Marco teórico

2.2.1 Biomateriales

Los biomateriales pueden ser definidos como una sustancia o compuesto de origen natural o sintético, que se pueden utilizar en algunos casos para aumentar la función corporal, el tejido u órgano por un periodo de tiempo, buscando reemplazar y, utilizándolos hasta en

la totalidad de un sistema tratado. Un biomaterial es un material utilizado para la fabricación de dispositivos para sustituir una parte o función de un sistema vivo de forma segura y que sea fisiológicamente aceptable [51], además es una sustancia no viable (capaz de funcionar después de su implantación) cuyo fin es la interacción con los sistemas biológicos [52]. Se ha dicho que un biomaterial ideal es aquel que no es citotóxico, imprimible, biodegradable, bioactivo y osteoconductor in vivo [53].

El uso de materiales en el cuerpo humano data desde los 2000 a.C., en culturas como la egipcia, hindú, china y griega, usando colmillos de elefantes y de otros animales, también madera, hierro y bronce, buscando reemplazar dientes, crear piernas artificiales de madera, hilos para sutura entre otros. Fueron encontradas aplicaciones en la antigua Fenicia, en la costa del mediterráneo, donde los dientes flojos estaban unidos con alambres de oro, atando con esto los dientes. Los mayas formaron dientes con conchas de mar aproximadamente 600 d.C., en Europa 200 d.C. fue encontrado un implante dental de hierro [54].

Una de las grandes aplicaciones de los biomateriales es en el área médica, los cuales pueden ser polímeros sintéticos, metales, cerámicas, inorgánicos y macromoléculas naturales (biopolímeros), que son procesados o fabricados como dispositivos médicos y de prótesis. Dicho uso fisiológico es posible gracias a buenas características de los biomateriales, provistos de una combinación adecuada de propiedades químicas, mecánicas, físicas y biológicas [55]. Cada año alrededor de 2.2 millones de personas en el mundo necesitan una cirugía de injerto óseo para la reparación de defectos de tamaños críticos derivados de accidentes, traumas o enfermedades [56].

Los biomateriales se pueden dividir según el tipo de material usado, así [51]:

A. Biomateriales metálicos: utilizados normalmente en osteosíntesis y artroplastias, son de alta resistencia transversal y de tensión, usados en implantes, placas, tornillos craneofaciales, partes de corazones artificiales, marcapasos, válvulas, equipos médicos, dispositivos de fijación ósea, productos de protección radiológica, y demás[57]. Dentro de los usados en aplicaciones médicas están el acero inoxidable (316L), titanio y aleaciones (Cp-Ti6Al4V), aleaciones cromo-cobalto (Co-Cr), aleaciones de aluminio, circonio-niobio y aleaciones de tungsteno.

B. Biomateriales Poliméricos: se utilizan como dispositivos cardiovasculares y proliferación de diversos tejidos blandos, son elásticos y resistentes al desgaste, usados

en aplicaciones ortopédicas, construcción de músculos y tendones artificiales, válvulas cardíacas, corazones artificiales, injertos vasculares, prótesis mamarias, materiales dentales, lentes intraoculares, sistemas de diálisis, materiales de recubrimiento de productos médicos, materiales quirúrgicos, etc.

Algunas de las ventajas de los polímeros respecto a otros materiales es su facilidad de fabricación, facilidad en procesabilidad secundaria, viabilidad en propiedades mecánicas y físicas y, costo razonable. Además, pueden clasificarse en sintéticos y naturales, los primeros incluyen sintéticos, acrílicos, poliamidas, poliésteres, polietileno, poli siloxanos, poliuretanos, etc. [52]. El gran defecto que presentan los materiales de origen sintético es su ausencia de biocompatibilidad, que puede superarse usando biopolímeros, por ejemplo, el quitosano, carrageno y alginato [58]. Por otra parte, polímeros naturales son de base biológica y biodegradable, pueden ser producidos por sistemas biológicos como los microorganismos, plantas, animales o sintetizados a partir de materiales biológicos como el almidón, azúcares, grasas, aceites naturales, entre otros.

C. Biomateriales Cerámicos: se caracterizan por su buena biocompatibilidad, capacidad de ensayo en una variedad de formas y porosidad, alta resistencia a la compresión, buenas características de desgaste y biodegradabilidad. Se utiliza en el sistema musculoesquelético, prótesis de cadera, rodillas artificiales, uso ortopédico, injertos óseos, revestimiento de metales, odontología y válvulas cardíacas. Las aplicaciones de cerámicas se han visto restringidas por la fragilidad y baja resistencia a la tracción, sin embargo la biocerámica de fosfatos es ampliamente usada por su alta biocompatibilidad e integración ósea, sumado a que son las más similares al componente mineral de los huesos [59].

Las apatitas ocupan un papel destacado en las cerámicas, pues los materiales a base de fosfato de calcio se han utilizado en aplicaciones en todo el cuerpo, también, en reconstrucción maxilofacial, otorrinolaringología y cirugía de columna [60], así como la hidroxiapatita se ha utilizado en relleno para defectos óseos y como implantes en sitios sobre los que anatómicamente no se ejerce carga, como hueso septal y oído medio [61].

Particularmente los materiales cerámicos son los más similares al componente mineral del hueso, resistentes a la corrosión y de bajo coeficiente de fricción, ejemplos de estos son el zirconio, alúmina, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, carbón pirolítico, silicato de

calcio y vidrios bioactivos. Además, de la búsqueda de la integración de estos materiales como medios para la liberación de drogas en el tejido implantado [62].

2.1.1.1 Hueso

El hueso es el principal constituyente del esqueleto, actuando como soporte del cuerpo y protección de las partes blandas y órganos vitales. Es diferenciado de otros tejidos conjuntivos porque está formado por componentes extracelulares mineralizados, que constituyen la matriz ósea, siendo denominado tejido duro [63]. En la parte interior del hueso se encuentra la medula ósea, encargada de producir células sanguíneas. El hueso es un tejido con alta capacidad para recuperarse de lesiones y, fisiológicamente actúa como fuente de almacenamiento de calcio, fosfato y otros iones, importantes para contracción muscular y actividad nerviosa [64], [65].

La forma que poseen los huesos dispone sus funciones mecánicas, clasificándose como huesos largos, cortos, planos, irregulares y sesamoideos. Los huesos largos están divididos en tres partes anatómicas: diáfisis, epífisis, y metáfisis. La diáfisis es la sección media principal de estos huesos, compuesta de hueso cortical y contiene médula o grasa. La epífisis es la parte final redondeada de los huesos que articula con un hueso adyacente cubierta con cartílago articular, compuesta de una capa delgada de hueso cortical que cubre un núcleo esponjoso. Entre la diáfisis y la epífisis radica la metáfisis, conformada por un tejido cartilaginoso que promueve el crecimiento del hueso, una vez termina el proceso de crecimiento se convierte en hueso esponjoso [66].

La matriz ósea está compuesta un 60% de material inorgánico y 40% de un componente orgánico, que juega un papel importante en las propiedades mecánicas del hueso. La matriz inorgánica se compone principalmente de iones de calcio y fosfato, con cantidades considerables de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio. Siendo la hidroxiapatita uno de los componentes inorgánico más significativos del hueso, al estar formada por los iones de calcio y fosfato. Así pues la HAp forma el 70% de los huesos, las fibras de colágeno tipo I el 20% y agua en un 10% [67], [68]. Los nanocristales de hidroxiapatita están dispuestos de manera que el eje c se orienta a lo largo de las fibras de colágeno.

2.2.2 Hidroxiapatita

En 1788 fue utilizado por primera vez el termino apatita por Werner, en la actualidad este término hace referencia a una familia de cristales correspondientes a la fórmula $M_{10}(Ro_4)_6X_2$, donde M es por lo general calcio, R es fósforo y X un hidroxilo [69].

La hidroxiapatita (HAp) es el principal componente de los huesos y dientes, razón por la cual ha sido altamente estudiada por sus propiedades biocompatibles, lo que hace que una de sus más amplias aplicaciones se encuentre en el área de la medicina en construcción y recubrimiento de implantes ortopédicos y dentales, pues promueve la osteointegración y aísla los iones metálicos, comportándose como barrera física. Además de ser usada como liberador de medicamentos de forma paulatina, siendo posible gracias a su propiedad osteoconductiva, además de ayudar a la regeneración del tejido óseo (osteogénesis) [70], [71].

La hidroxiapatita es un mineral cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, con grupo espacial P63/m. Este fosfato está clasificado como una estructura hexagonal, con valores de red $a=b=9.432\text{\AA}$ y $c=6.88\text{\AA}$. Su punto de fusión es superior a 1500°C , y densidad calculada de 3.219 g/cm^3 . El carácter iónico de la hidroxiapatita hace posible que se sustituya total o parcialmente iones de la red por otros de tamaño similar (PO_4^{3-} por HPO_4^{2-} , Ca^{2+} K^+ o Mg^{2+} , OH^- por F^- , Cl^- , Br^-) [71]. La figura 1 muestra la estructura de la HAp. Por otro lado, cuando los fosfatos de calcio, al cual pertenece la HAp, poseen una relación atómica Ca/P entre 1.5 y 1.67, son llamados apatitas, pudiendo ser de tipo fluorapatita o hidroxiapatita. es 1.6667. Sin embargo, algunos materiales denominados hidroxiapatita por diversos investigadores presentan relaciones variables de Ca/P desde 2.0 hasta valores como 1.3. Relacionado a esto la American Society for Testing and Materials ha dictado que debe ser de 1.67 [69].

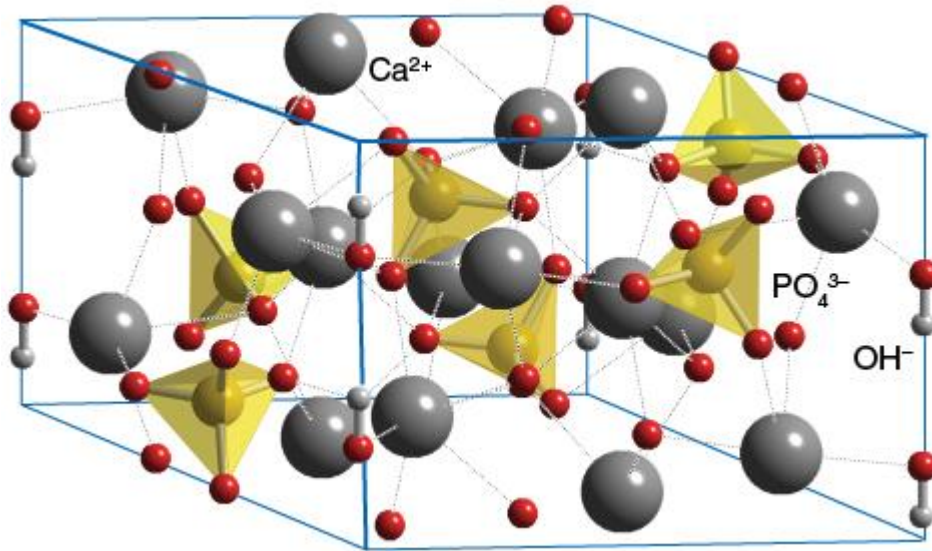


Figura 1. Estructura de la hidroxiapatita [72].

La figura 1 muestra la estructura de la hidroxiapatita. Cabe resaltar que la hidroxiapatita extraída de fuentes biogénicas debe denominarse BHA, y difiere de la HAp al no ser estequiométrica debido a que contiene iones como NA, Zn, Mg, K, Si, Ba, entre otros [11], [12]. La BHA se obtiene por calcinación ósea en un rango 600° a 1200°C por lo general.

En general, los biomateriales se pueden estudiar en relación con unas características especiales, las cuales son: su estructura espacial, medición de las características de la superficie, y determinación de la composición y estructura, transformación de fase y distribución de peso molecular. La biomecánica, estructura y propiedades de degradación, son características importantes para la aceptación o rechazo celular que pueda tener un implante artificial. Además, las propiedades biomecánicas, estructurales, y de degradación de los biomateriales afectan la aceptación por parte del tejido circundante, la respuesta celular y regeneración [16].

2.2.2.1 Métodos de Obtención

La hidroxiapatita tiene diversas fuentes de obtención, desde su extracción en yacimientos de roca hasta su síntesis utilizando materiales biológicos o sintéticos. Desde sintetización química se encuentran los métodos de precipitación, hidrotermal y sol-gel, y tiene fuentes

naturales como los colares, escamas, cáscaras de huevo, huesos de animales, etc. Es debido a esto que los métodos de producción han sido clasificados en diferentes tipos.

Síntesis química

De esta manera la HAp puede ser obtenida a partir de una fuente de calcio y otra de fosfato, buscando que la relación Ca/P= 1,67. Es posible dividir la obtención por síntesis química en dos tipos: síntesis de química húmeda y de química seca [44].

A. Síntesis de química húmeda

Los métodos húmedos de sintetización de hidroxiapatita comprenden:

a. Hidrólisis

Los métodos de hidrólisis para obtención de hidroxiapatita normalmente comprenden dos etapas: disolución y precipitación [73]. El proceso de hidrólisis depende del pH y la temperatura. Generalmente se usan precursores fosfatos de calcio como fosfato de octacalcio, dihidrato de fosfato tricálcico y fosfato tricálcico [74]. Relativo con la obtención de HAp por este método, se ha utilizado como precursores el fosfato dicálcico dihidrato ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, DCPD) y $CaCO_3$ [75].

b. Hidrotermal

Este método describe la reacción entre la fuente de calcio y la del precursor del fosfato en presencia de agua o un solvente orgánico. El proceso ocurre en un espacio confinado con temperatura y presión superiores a la natural autógena, llegando el medio a ser crítico o subcrítico de acuerdo con la temperatura y presión. Según estas variables pueden conseguirse con este método síntesis altamente cristalinas [76]. Este método da la posibilidad de modular las interacciones entre sólido/solvente, y control de la nucleación y crecimiento [77]. Se ha obtenido buenos resultados con HAp obtenida por este método, aplicándola incluso en animales[78].

c. Precipitación

Este método generalmente se lleva a cabo precipitando fosfato de calcio, hidroxilo de calcio, u ortofosfato de hidrógeno diamónico, sumado al control de parámetros como la estequiometría, pH, velocidad de adición, fuerza iónica, temperatura, entre otros [37].

d. Sol-Gel

Este es un método de mineralización a partir de precursores en una solución, preferiblemente organometálicos u otros precursores pertinentes. Este implica hidrólisis de los precursores y formación de micelas alrededor de plantillas en una fase acuosa u orgánica, y posterior policondensación de estas especies a través de una red orgánica [79]. Ocurre bajo condiciones denominadas de química suave, que son considerablemente menores que las rutas convencionales en procesos sintéticos respecto a la temperatura. Tiene limitaciones para la producción a escala industrial, gracias a factores como costos, escases de precursores y control del proceso [80]. Para la obtención de hidroxiapatita se han usado precursores como nitrato de calcio, fosfato ácido de amonio, hidróxido de amonio y sal disódica [51].

e. Doble descomposición o coprecipitación

Consiste en una fuente de reacción del PO_4^{3-} ligado con una fuente de calcio en presencia de otros aditivos [81], aunque las condiciones de este método son variables normalmente se lleva a cabo bajo valores de pH de 3 a 12, y temperaturas ambientes hasta la de ebullición del agua.

f. Métodos de emulsión

Este método se considera eficiente, simple y adecuado para la producción de HAp nanoestructurado [82]. Entre los tensioactivos para la preparación de la emulsión están la sal de dioctil, sulfosuccinato de sodio, dodecil fosfato, polixietileno, éter nonilfenol, brocuro de cetiltrimetilamonio, entre otros. Los parámetros de síntesis se centran en el tipo de tensioactivo, relación de fases acuosas, pH y temperatura [80]. Para la síntesis de HAp por este método, se ha utilizado compuestos como $CaCl$ y $(NH_4)_2HPO_4$ [36].

Los métodos húmedos son ampliamente utilizados por la simplicidad de los procedimientos, control de la estructura, morfología y un alto rendimiento de la HAp. Se pueden realizar con variaciones de presión y temperatura, sin embargo, estos métodos presentan problemas en la cristalinidad resultante, pues acarrean impurezas en la estructura cristalina.

g. Sonoquímica

Los métodos sonoquímicos permiten la formación de partículas uniformes resultantes de las reacciones químicas en presencia del ultrasonido. El uso de estas ondas acelera

reacciones químicas como la síntesis y la catálisis. Estos métodos se han estudiado en busca de materiales novedosos provistos de características inusuales y, se han creado muchos tipos de nanomateriales con diversas formas [83].

B. Síntesis de química seca

La síntesis de hidroxiapatita por métodos secos se basa en el tratamiento térmico de los precursores mezclados finamente molidos, buscando una buena homogenización de los componentes.

a. Reacción en estado sólido

En estas por lo menos interviene un sólido, pueden ser sólido-sólido, sólido-líquido o sólido-gas. Las reacciones en estado sólido es una de las técnicas más importantes en la preparación de sólidos policristalinos, no solo en forma de polvos sino también como sólidos densificados. Estas solo se llevan a cabo a temperaturas altas, procurando disgregar una mezcla íntima de los reactivos en pequeñas gotas y, eliminar el disolvente mediante diferentes técnicas [84].

b. Método de molienda de bolas

Es un proceso mecanoquímico, ha sido usado para sintetizar hidroxiapatita por sus ventajas como la simplicidad, reproductibilidad y producción a gran escala. El control de crecimiento de la HAp depende en gran medida de los componentes utilizados, el medio de la molienda, el diámetro de las bolas de molienda, el tipo de atmósfera, la duración de los pasos de fresado y las pausas entre intervalos, la relación de masa entre el polvo y las bolas y la velocidad de rotación [80], [85].

Hidroxiapatita obtenida por fuentes naturales

En relación a la hidroxiapatita basada en fuentes biogénicas se pueden identificar algunos grupos, como lo son los reactivos biogénicos donde se utilizan cáscaras de huevo y exoesqueletos de organismos marinos, por ejemplo el CaO producidos a partir de cáscara de huevo por calcinación a alta temperatura se hidrata y reacciona con H_3PO_4 para precipitar HAp [86]. Análogamente, el esqueleto de pez en la reacción con

dihidrogenofosfatos de amonio [87], y la síntesis mecano química utilizando CaO obtenido de conchas marinas, que son posteriormente molidos [67], son fuentes para la obtención de HAp.

Sumándose a estas, otra de las fuentes son los huesos de otros animales, lo que ha sido campo de estudio para las aplicaciones biomédicas. Una de las fuentes más utilizadas en esta rama son las de hueso de bovino, produciéndose por diferentes compañías para su distribución comercial, donde se ofrecen como “cerámicas naturales de hidroxiapatita osteconductora”, que brindan una solución para diferentes patologías óseas.

Hay algunos productos comerciales bien establecidos disponibles, obtenidos (principalmente) de hueso bovino en el mercado, como se mencionó anteriormente, que están respaldados por un gran volumen de literatura sobre su éxito como xenoinjerto o relleno. Estos productos son comúnmente utilizados por cirujanos dentales y ortopédicos y se derivan de huesos de animales, principalmente de bovinos. A continuación, se describe una selección de productos disponibles. Estos son obtenidos mediante procesos de temperatura, la cual varía dependiendo del método específico que se emplee. Además, los resultados de la utilización de este materiales ha resultado positiva, sin embargo algunos casos indican resultados de baja integración de los injertos [29].

2.2.3 Métodos de caracterización

El análisis de las propiedades cristalinas de los compuestos ha sido motivo de estudio, entre otras razones porque el tamaño de la partícula, el control de la estructura cristalina y compuestos de HAp unidos con otros elementos podrían llevar a un importante avance en materiales con aplicaciones biomédicas [88]. Dentro de los métodos para evaluar las propiedades cristalinas de los materiales están: la difracción de rayos X DRX, termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencia y calorimetría de escaneo diferencial [16].

2.2.3.1 Termogravimetría (TG)

La termogravimetría hace parte de los análisis térmicos, los cuales aluden al cambio de las propiedades de una muestra relacionadas con la alteración de su temperatura. Por

propiedades se entienden las termodinámicas (temperatura, calor, entalpía, masa, volumen, etc.), las del material (dureza, módulo de Young, susceptibilidad, etc.), composición química o estructuralmente.

La termogravimetría (TG) es una técnica experimental usada para monitorear el cambio físico y químico al someterse a calentamiento una muestra. Aquí se hace medición de la masa de la muestra como una función de la tasa de calentamiento o del tiempo que esté sometida a la temperatura, obteniendo con ello curvas TG. Por lo que el sistema no debe ser cerrado ya que no podría haber una variación de la masa de la muestra. Diferentes efectos que puede sufrir la muestra en su interacción con la atmósfera relacionados a su masa (ganancia o pérdida). Los procesos que se pueden dar son la evaporación, deshidratación, pérdida o ganancia gaseosa, humedad y procesos susceptibles a esos procesos, oxidación de metales en aire u oxígeno, descomposición oxidativa de sustancias orgánicas, reacciones químicas heterogéneas y cambios en las propiedades magnéticas [16], [89].

Para realizar este estudio son empleadas las termobalanzas, la diferencia entre las estas puede hacerse en base al arreglo de la muestra en relación con el sistema de pesaje, es decir, debajo del receptor de carga (vertical), arriba del receptor de carga (vertical), horizontal. La figura 2 muestra un diagrama de la configuración de un instrumento de este tipo.

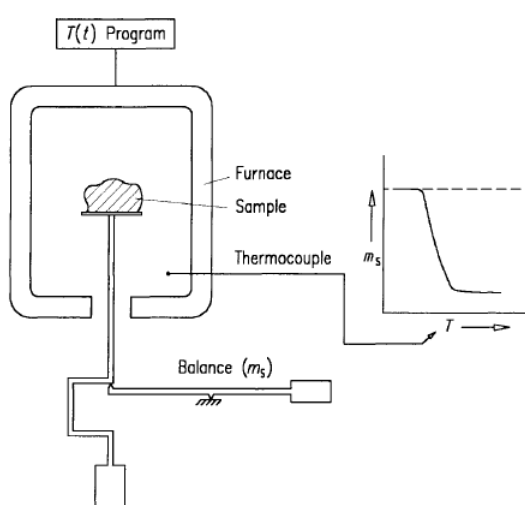


Figura 2. Configuración básica de una termobalanza [90].

Uno de los aspectos importantes a la hora de hacer TG es la elección de la tasa de calentamiento, generalmente entre más alta sea la relación de temperatura/tiempo causa reacciones a temperaturas más altas. Así pues, la elección de la velocidad de calentamiento es particularmente significativa debido a que reacciones secundarias se pueden dar con diferencia de temperatura muy pequeña la una de la otra, gracias a ello si se escogen temperaturas de calentamiento muy altas pueden superponerse y no ser detectadas; afortunadamente se puede evitar haciendo la elección correcta [89].

Adicional a la curva TGA, un número de otras curvas pueden ser usadas para propósitos de interpretación:

- La primera derivada (curva DTA, tasa o cambio de masa).
- Las curvas DTA (differential thermal analysis), muestran eventos exotérmicos o endotérmicos similares a DSC, pudiendo interpretarse similarmente.
- EGA (envolved gas analysis), en línea con mediciones de FTIR o MS de gases evolucionados.

La figura 3 muestra curvas TGA típicas.

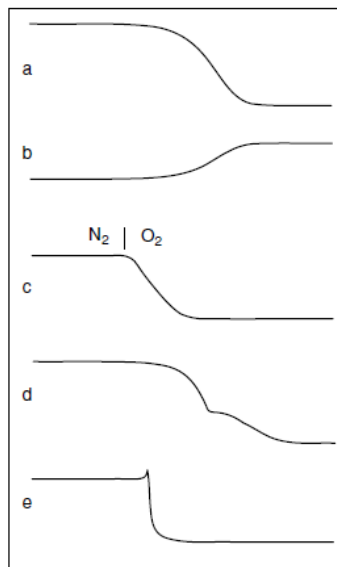


Figura 3. Curvas TGA de reacciones químicas diferenciales. (a) Descomposición térmica con reacción de productos volátiles, (b) Corrosión oxidación de metales, (c) Combustión de carbon negro al cambiar de N₂ a O₂, (d) Múltiples pasos de descomposición, (e) descomposición explosiva con efectos de retroceso [89].

Los análisis de termogravimetría han sido ampliamente usados para el estudio de la HAp, obteniendo gracias a ello importantes hallazgos como lo demuestra un estudio en el que se encontró que el sometimiento a los procesos de temperatura es un paso necesario para obtener muestras de HAp con propiedades mecánicas similares a las de los huesos [91]. Particularmente en bovinos con análisis TG se encontró que es un buen material para injertos por su excelente biocompatibilidad, al tener gran similitud con el hueso natural y otros materiales usados en ese entonces en los injertos óseos [92].

En resumidas cuentas, el análisis TG es muy útil para estudiar los porcentajes de los componentes, interacción y transformación de las estructuras a razón del calentamiento, conocido como degradación de fases, orgánicas e inorgánicas.

2.2.3.2 Análisis por difracción de rayos X (DRX)

Métodos de difracción como difracción de rayos X, difracción de neutrones y difracción de electrones son los más importantes para caracterización estructural de biomateriales en una forma cristalina. Este método se basa en la difracción de rayos X en el parámetro de red, dependiendo de la dispersión de los rayos X por la densidad electrónica de átomos y moléculas. Los máximos de difracción se logran cuando los rayos dispersados de los planos del cristal están en fase, obedeciendo a la ley de Bragg. Esta ley se puede usar para determinar el tipo y parámetros de la red cristalina simple [16]. Para las estructuras cristalinas complejas, es necesario tener en cuenta el factor de estructura geométrica. Algunas investigaciones han usado este método para determinar la composición cualitativa y cuantitativa, tamaño de cristalito de las fases y el grado de cristalinidad de materiales biocompuestos [93], [94].

La ley de Bragg se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Donde n representa el orden de difracción y d la distancia interplanar del cristal.

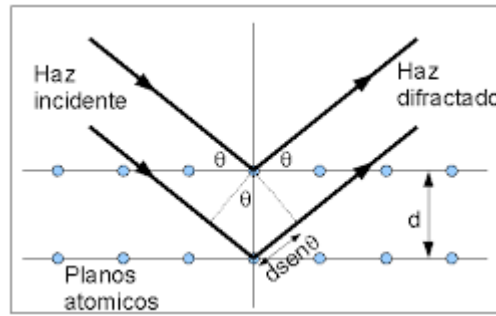


Figura 4. Interacción de rayos X con la estructura cristalina [64]

La difracción se produce cuando el espacio entre las capas atómicas es aproximadamente igual a la longitud de onda de la radiación y que los centros de dispersión estén distribuidos de una manera regular. La figura 4 representa la interacción entre los haces de rayos X y los planos del material, evidenciando el ángulo y distancia interplanar relacionados en la ley de Bragg.

Las estructuras cristalinas poseen una relación característica de la distancia interplanar con los parámetros de red y los índices de Miller. Las estructuras hexagonales tienen una relación dada por la siguiente expresión [64]

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3a^2} (h^2 + k^2 + hk) + \frac{1}{c^2} l^2$$

Donde a y c son los parámetros de red de la estructura cristalina, h , k y l los índices de Miller característicos de cada plano cristalográfico. Es posible encontrar los parámetros de red de la estructura utilizando los difractogramas obtenidos con la difracción de rayos x, la ley de Bragg y la ecuación característica de la estructura.

Así mismo el tamaño del cristalito se puede encontrar a partir de los patrones de difracción y utilizando la ecuación de Scherrer

$$t(hkl) = \frac{k\lambda}{B \cos \theta_{(hkl)}}$$

Donde $t(hkl)$ es el tamaño promedio de cristalito, λ es la longitud de rayos x, B es el ancho medio del pico de mayor intensidad, θ es el ángulo de difracción y K la constante propia del material que es relativa al tamaño del cristalito y material[64].

Algunos estudios dicen que los picos en los difractogramas representativos de la HAp muestran evolución de la cristalinidad con el tratamiento térmico. Obteniendo estructuras

de baja cristalinidad por debajo de 800°C, y por encima de esta temperatura picos más agudos y menos amplios [95].

2.2.3.3 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) es actualmente uno de los métodos de espectroscopia vibracional más comunes utilizados en biomateriales. Esta brinda información sobre los aspectos composicionales de las muestras de estudio, de una manera rápida y con una pequeña cantidad de la muestra, la cual puede estar de forma sólida, líquida o gaseosa.

FT-IR, es una técnica de medición la cual permite el registro de los espectros infrarrojos, gracias a la transformada de Fourier se logra obtener la salida de luz en función de la longitud de onda que incide sobre la muestra. El detector en los espectros FTIR monitorea continuamente el número de onda emitido en el rango IR y un computador lo convierte en espectro de absorción, donde pueden ser de simple o doble haz produciendo un espectro de transmitancia.

La absorción de la radiación IR por las muestras depende de la masa atómica, y de la longitud de onda, la fuerza y constantes de fuerza de los enlaces interatómicos de las estructuras del material. También, la absorción está relacionada con la simetría de la celda unitaria y la simetría del sitio local de cada átomo dentro de la celda [96].

El espectro infrarrojo es formado como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética en frecuencia correlacionadas con la vibración de conjuntos específicos de enlaces químicos dentro de una molécula. Para entender el fenómeno físico que allí ocurre se debe entender que la energía de una molécula en términos de sus constituyentes es [97]:

$$E_{total} = E_{electrónica} + E_{vibracional} + E_{rotacional} + E_{translacional}$$

$E_{translacional}$ = esta relacionada con el desplazamiento de moléculas en el espacio como una función del movimiento térmico normal de la materia.

$E_{rotacional}$ = es el movimiento de volteo de una molécula, que es el resultado de la absorción de energía dentro de la región de microondas.

$E_{vibracional}$ = es una energía superior correspondiente a la absorción de energía por una molécula como el componente de vibración atómica sobre el centro medio de sus enlaces químicos.

E_{total} = está relacionado a las transiciones de energía de los electrones a medida que se distribuyen por toda la molécula.

Para que la actividad infrarroja ocurra debe haber un cambio neto en el momento dipolar durante la vibración para la molécula o el grupo funcional en estudio, lo cual es denominado vibración activa en infrarrojo. De este modo, cuando el complejo movimiento vibratorio de una molécula se puede descomponer en una serie de vibraciones constituyentes llamadas modos normales.

Adicionalmente, para darse la absorbancia del espectro infrarrojo es necesario que la energía de la luz incidente sobre la molécula debe ser igual a una diferencia de nivel de energía vibracional dentro de la molécula de estudio. Lo cual se puede plantear como [98]:

$$\Delta E_{vibracional} = hcW$$

$\Delta E_{vibracional}$ = energía vibracional de nivel de diferencia en una molécula

h = Constante de Planck (Joule-sec)

c = velocidad de la luz

W = número de onda

Con la intención de entender mejor la relación entre la frecuencia electromagnética absorbida por la molécula, y la frecuencia de vibración del modo normal excitado por dicha luz se muestra la siguiente ecuación[98].

$$v = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\mu} \right)^{1/2}$$

La masa reducida hace referencia a la relación $\frac{(M_1 M_2)}{(M_1 + M_2)}$ donde $M_1 M_2$ son las masas de los dos átomos involucrados, por lo cual esto junto con la fuerza del enlace químico, determinará el número de onda en el cual la molécula absorberá la radiación.

Con relación a las gráficas arrojadas por este tipo de estudio, el eje x representa el espectro infrarrojo en relación con su intensidad. Los picos que se observan en las gráficas son

también llamados picos de absorbancia, que corresponden a vibraciones de los átomos de la muestra cuando es expuesta a la región del espectro infrarrojo, normalmente entre 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} .

2.2.3.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En la microscopía electrónica de barrido MEB, o por sus siglas en inglés SEM, un haz de electrones acelerado a alto voltaje, es enfocado a la superficie de la muestra a estudiar por una serie de lentes electromagnéticas que escanea dicha superficie por medio de bobinas de reflexión y en sincronía con un tubo de rayos catódicos. Las señales producidas como resultado de la interacción del haz con la superficie de la muestra son recolectadas por un detector apropiado, amplificado y mostrado en el tubo de rayos catódicos. Generalmente al recopilar los datos se genera una imagen bidimensional que evidencian los cambios espaciales debidos a las características de la superficie. Las señales obtenidas de esta técnica entregan información sobre la morfología externa, la composición química, y la estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen la muestra [99].

Los dispositivos para medición MEB son de alto costo y requieren que las mediciones se hagan en vacío, excepto para el SEM ambiental. Además, la muestra debe ser conductora y, en caso de no serlo debe depositarse con una capa de oro en la superficie a investigar [100]. La energía cinética de los electrones utilizados en SEM es considerable, esta se disipa de manera variada por la interacción con la muestra generando diferentes señales, las cuales incluyen electrones secundarios, que producen las imágenes SEM, electrones retrodispersados, electrones retro difractados dispersados (usados para determinar la estructura cristalina y la orientación), fotones, luz visible, y calor. Así pues, los electrones secundarios son capturados para posteriormente formar la imagen [5]. Es decir, las micrografías y elementos que componen la muestra (por rayos X) se obtiene gracias a las señales emitidas por la muestra y se forma a medida que el haz se desplaza en una porción de la superficie, la señales varían según el punto analizado a cada instante, así pues, a diferencia de la imagen óptica la obtenida por este método es una imagen virtual obtenida por las señales de la muestra [101].

La figura 5, muestra el principio de funcionamiento de la microscopia electrónica de barrido. Los electrones son acelerados desde un cátodo termoiónico o de emisión de

campo entre cátodo y ánodo, la sección más pequeña del haz es magnificada mediante un sistema de lentes de dos o tres etapas: la corriente, la apertura y el tamaño, donde pueden variarse pero no de forma independiente, al cambiar las excitaciones de las lentes condensadoras y la limitación de la apertura en la última lente formadora de sonda, son necesarias aperturas más pequeñas para aumentar la profundidad de enfoque y mejorar la resolución angular de la canalización de electrones. Un sistema de deflexión de bobina frente a la última lente escanea la sonda de electrones a través de la muestra y sincronizado con un haz de electrones de un tubo de rayos catódicos (CRT), la intensidad de este se modula por las señales que registra para formar una imagen [102].

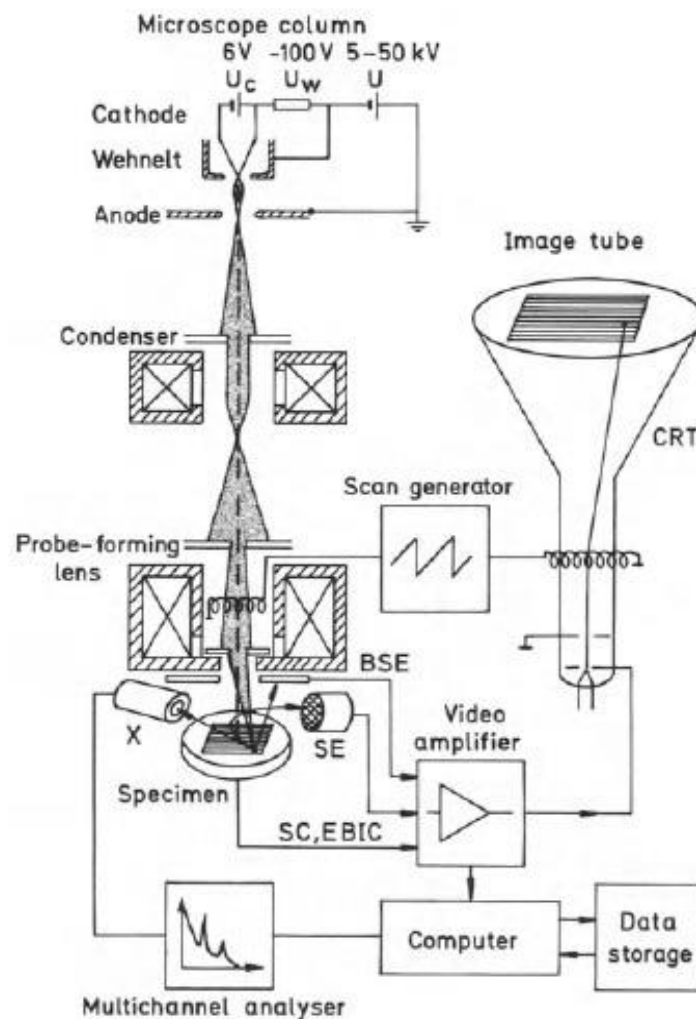


Figura 5. Principio de la microscopía electrónica de barrido (BSE= backscattered electrons, SE= secondary electrons, SC=specimen current, EBIC=electron beam-induced current, X=x-rays, CRT=cathode-ray tube) [102].

2.2.3.5 Dispersión de energía de rayos X (EDS)

Por lo general esta técnica es complementaria a la microscopía electrónica de barrido (SEM). Permite determinar los elementos químicos presentes en la muestra y su cantidad relativa en un volumen. El haz de electrones altamente energético incide en la muestra, los electrones interactúan con los de orbitas internas y producen la expulsión de estos desde los átomos, para que el átomo regrese al equilibrio emite un fotón de rayos X. La energía del fotón se relaciona con el peso atómico del átomo, y este a su vez con un tipo de elemento [5].

Capítulo 3: Metodología

Para realizar la síntesis de hidroxiapatita se utilizaron los huesos de tibia y fémur de un macho ovino de aproximadamente 2 años. Inicialmente el hueso se sometió a una fase de desproteinización, que consiste en la realización de un proceso hidrotérmico, donde primero se extrae la médula ósea (diáfisis), rótula, membrana lipídica y tejidos blandos. Posteriormente, se colocan los huesos en una olla pitadora con agua, allí son sometidos a una cocción de aproximadamente 30 minutos. A continuación, se retiran los tejidos que hasta el momento no han podido ser eliminados y se parten los huesos en astillas con un tamaño de alrededor de 3 cm. Luego se llevan a un horno microondas a una potencia de 700W en una solución de agua y detergente, durante 30 minutos en cuatro oportunidades, renovando la solución en cada una. Seguidamente, las astillas fueron lavadas con agua de grifo [5], y posteriormente se realizó el secado de las piezas colocándolas, sin la presencia de líquido, en el microondas durante 30 min.

Después, se realizó la molienda mecánica de los trozos de hueso, para esto se utilizó un molino con bolas de acero inoxidable 304, se realizan 100rpm y se molieron durante aproximadamente dos días por intervalos de tiempo, hasta que se obtuvieron un polvo de alrededor de 38 μm .

La figura 6 muestra un diagrama que resume las etapas empleadas para obtener los fosfatos de calcio a partir de hueso de ovino y los métodos de caracterización para analizar las muestras. Del mismo modo, las figuras 7 (a), (b), y (c) contiene imágenes correspondientes a algunos de los procesos por los que pasaron las muestras.

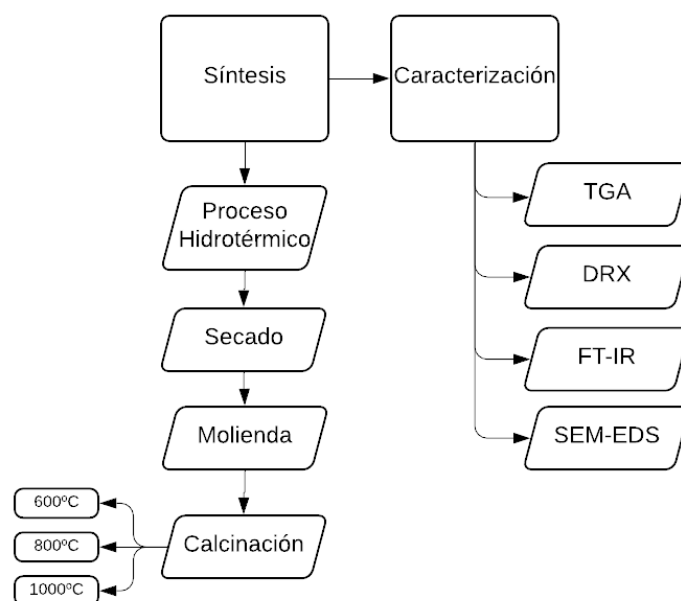


Figura 6. Diagrama de bloques de obtención y estudio de HAp.

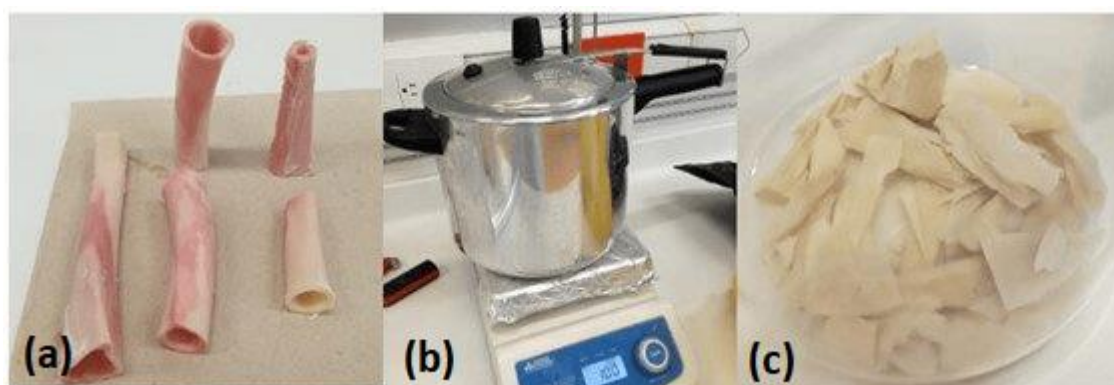


Figura 7. (a) Huesos de ovino, (b) proceso de cocción y (c) astillas de hueso.

Las muestras se calcinaron en un horno marca mufla Acequilabs modelo MF_2003, mostrado en la figura 8. Se utilizaron temperaturas de calcinación de 600°C, 800 y 1000 °C, con una rampa de subida de 5 °C/min, N_2 como gas de arrastre y, una vez alcanzada la temperatura deseada se dejaron las muestras durante 24 horas.



Figura 8. Horno Mufla del Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales [5].

Para caracterizar las muestras, se utilizan las técnicas de análisis termogravimétrico (TGA) con un equipo Q50 V20.13 Build 39, y una rampa de subida de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde temperatura ambiente hasta 950°C , el gas de arrastre fue N_2 suministrado a $60\text{ml}/\text{min}$, realizado en la Universidad Nacional sede Manizales.

También, microscopía electrónica de barrido con análisis elemental y dispersión de energía de rayos x (SEM-EDS) un instrumento Sigma 300 marca ZEISS, los análisis fueron hechos en la Universidad Nacional sede Medellín.

Para difracción de rayos X (DRX) en un equipo D8 Bruker AXS con geometría de haces paralelos, usando una fuente de cobre k- α con longitud de onda $\lambda = 1.5406\text{\AA}$, la figura 9 muestra el equipo utilizado.

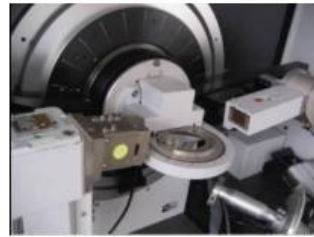


Figura 9. Difractómetro de rayos x del Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

La espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada rápida de Fourier (FTIR) con un equipo BRUKER, accesorio TTR platinum Diamond 1, y resolución de 4cm^{-1} . La figura 10 muestra el equipo usado para realizar esta prueba.

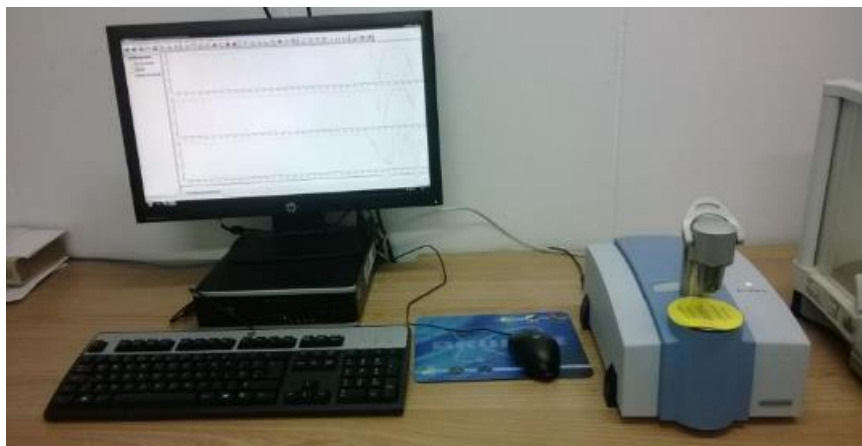


Figura 10. Espectrómetro Infrarrojo por Transformada Rápida de Fourier del Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

Capítulo 4: Análisis de Resultados

4.1 Microscopia electrónica de Barrido MEB

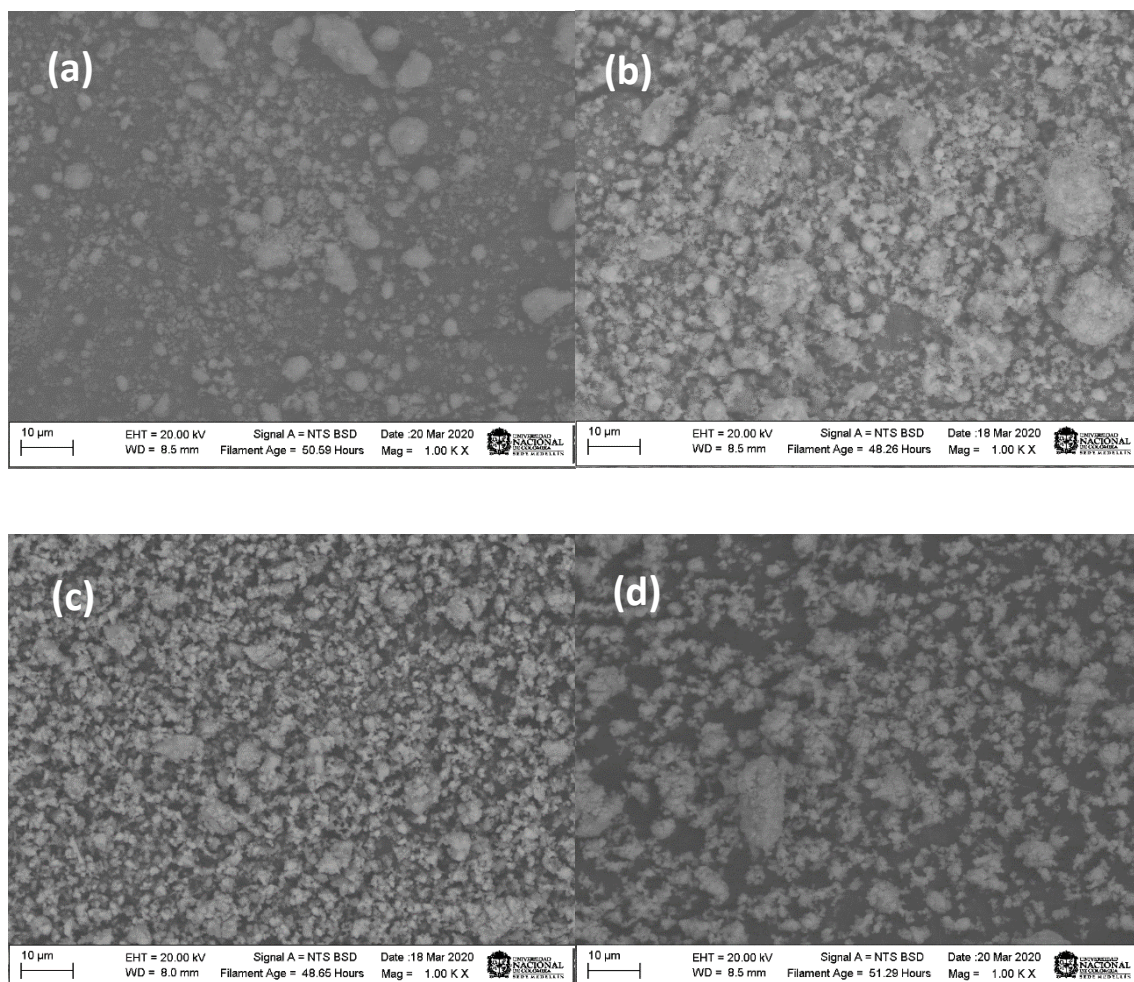


Figura 11. De (a) a (d) se están las imágenes SEM (1,00KX) para la muestra sin calcinar, y las calcinadas a 600°C, 800°C y 1000°C respectivamente.

La figura 11 (a), muestra el polvo de hueso de ovino sin pasar por el proceso de calcinación donde el granulado aún no es evidente. De la figura (b) a la (d) tenemos las muestras que fueron sometidas a 600°C, 800°C y 1000°C, tomadas a 1000 aumentos. De acuerdo con los análisis TG, la considerable pérdida de masa hasta 600°C es significativa para las transformaciones físicas de la muestra de la figura (a) respecto a la (b), esto se debe a que los cambios térmicos entre estas se encuentran asociados a cierta descomposición orgánica. También en ambas se ven granos aglomerados, formando distribuciones tipo coliflor, y es notorio que para las dos primeras existe un cambio en la

formación de gránulos. Por otra parte, en las figuras 11 (c) y (d) se puede notar un crecimiento del espacio intergranular, el cual se puede asociar a la pérdida de la fase orgánica, es decir, que con el aumento sistémico de la temperatura la morfología va presentando cambio, desarrollándose con ello una morfología esférica. En la figura 11 podemos evidenciar como con el aumento de la temperatura incrementa la formación de los gránulos y disminuye la aglomeración en las muestras, sin embargo, en la figura 11 (c) hay un aumento en la separación de las muestras generalmente este aumento entre distancia entre granos suele ser asociado a la porosidad de la muestra, dichos poros se presentan de manera arbitraria en la muestra y, al igual que los granos no presentan continuidad. En general las figuras presentan un aspecto rugoso, aspecto significativo para la adhesión celular.

4.2 Energía Dispersiva de Rayos X

Tabla 1. Relación Ca/P de las muestras de polvo de hueso ovino (PHO) estudiadas.

Muestra	Relación Ca/P
PHO	2,22
PHO a 600°C	1,88
PHO a 800°C	1,76
PHO a 1000°C	2,22

En la tabla 1 se presenta la relación Ca/P para las muestras de polvo de hueso ovino sometido a diferentes temperaturas. La muestra sin ser sometida a temperatura de calcinación presenta una relación de 2.22, lo que posiblemente puede indicar que se tiene en este punto un fosfato de tetracalcio [48]. Para el tratamiento a 600°C se evidencia que la energía suministrada, aunque bien es suficiente para promover la pérdida de la materia orgánica no lo es para lograr la formación de hidroxiapatita estequiométrica, sin embargo, la relación se mantiene en el rango de la apatita biológica. Ahora, para la muestra sometida a 800°C la hidroxiapatita es cercana a la estequiométrica. A 1000°C la muestra se desestabiliza provocándose un aumento del porcentaje de calcio en relación con el de fósforo, lo que indica una sustitución considerable de los iones de fosfato por los de carbonato [103]. De igual manera, la riqueza de calcio de las muestras sometidas a 800° y

1000° se puede asociar a la impureza de CaO [104], lo cual es confirmado con los picos observados en los difractogramas correspondientes a estas.

Además, la información suministrada por este tipo de técnica arroja que las muestras tienen presencia de calcio, fósforo y oxígeno, además particularmente en las muestras sometidas a 600°C y 800°C se encuentra presencia de carbono.

4.3 Análisis termogravimétrico y Primera derivada

En la figura 12 (a) y (b) puede observarse una pérdida de masa mínima entre 400°C y 500°C, denota la descomposición de hidróxido de calcio, carbonatos en agua y dióxido de carbono [39]. Los cambios producidos a temperaturas inferiores de alrededor de 670°C corresponde a la descomposición orgánica de grasas y proteínas [12], [31], y para temperaturas mayores a dicho valor los cambios térmicos se relacionan con transformación fisicoquímica de la bio HAp [12]. La pérdida de masa entre 200°C y 500°C corresponden a la degradación y combustión del colágeno. Al realizar la comparación entre la curva TG con la de la primera derivada de esta se encuentra la correspondencia esperada con un pico que evidencia una considerable degradación en 644°C, debida a la última transformación de proteínas.

De acuerdo al análisis termogravimétrico, se da un cambio de 9.67% hasta 200°C debido a la pérdida de agua absorbida química y físicamente, y a la descomposición de parte de la materia orgánica; de 22.97% que se evidencian con picos considerables en la curva de la primera derivada, correspondiente a la descomposición orgánica y desneutralización de las grasas lo cual se da entre 200 y 650°C, y una variación de 3.66% a partir de 650°C hasta 760° a razón de la descomposición de la pérdida de carbonato de la matriz orgánica y parte de los carbonatos. Un 0.38% en temperaturas mayores a 760°C y hasta el límite 950°C, que normalmente se debe a la formación de oxiapatita y óxido [12]. Estos dos últimos porcentajes de pérdidas, al tratarse de la descarboxilación de la muestra, da paso a la liberación de CO_2 .

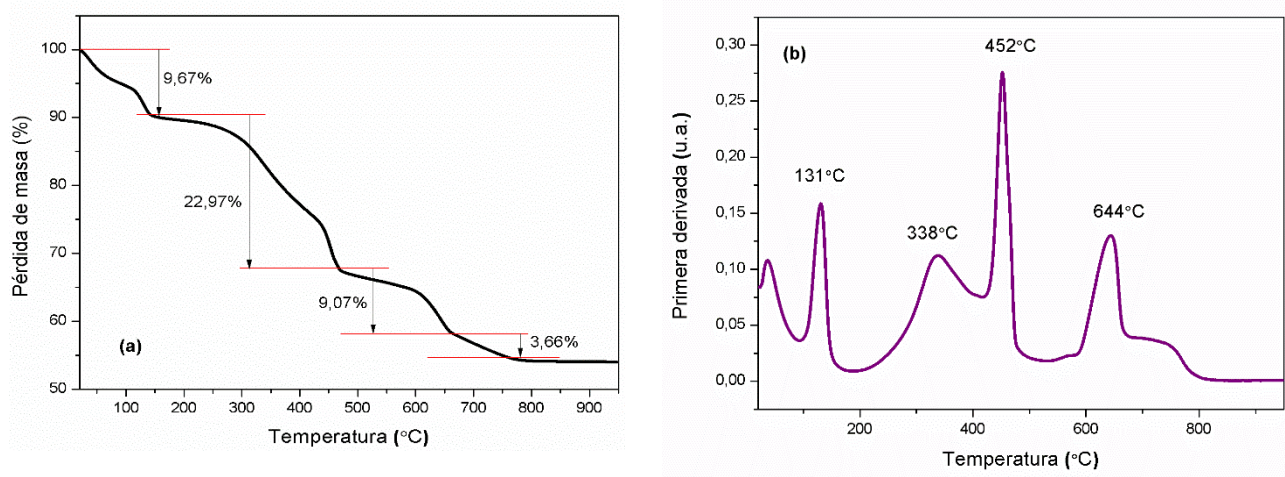


Figura 12. (a) Muestra la curva TG del polvo de hueso de ovino y su (b) primera derivada al ser sometido a un rango de temperatura de ambiente a 950°C con una tasa de 5°C/min.

4.4 Difracción de rayos X

La figura 13, representa patrones típicos de DRX de polvo de HAp sintetizada a temperaturas de 600°C, 800°C y 1000°C respectivamente. En ellas se revela la presencia de las fases de HAp consistentes con la bases de datos encontradas en *Crystallography Open Database* con tarjeta 1521038 [105]. Los índices (hkl) principales para HAp: (002), (210), (211), (112), (022), (310), (222) y (213) son identificados en la figura 13, evidenciándose como el más intenso el (211). Los porcentajes de cristalinidad de las muestras fueron 42.48%, 89.94% y 89.77% para las muestras a 600°C, 800°C y 1000°C respectivamente. Esto fue calculado usando los difractogramas, donde se consideró el pico de mayor intensidad y un mínimo cercano prudente [106]. Es notorio que de 600°C a 800°C se presenta un aumento considerable en la cristalinidad, por lo cual a 600°C la muestra se considera amorfa, esto a causa de que a esta temperatura no ha sido eliminada completamente la materia orgánica del polvo de hueso [5].

Adicionalmente, se halló el tamaño del cristalito asociado a las muestras utilizando el ancho medio de los picos (FWHM), el cual está vinculado a la ecuación de Scherrer. Se

obtuvieron los tamaños de cristalito de 26.36 ± 7.80 nm, 54.42 ± 7.16 nm y 51.48 ± 5.47 nm, estos son los valores correspondientes a cada temperatura (600°C , 800°C y 1000°C) acompañados de la desviación que presentan dichos datos. Los cambios en la fase mineral del polvo de hueso por la pérdida de materia orgánica lleva al incremento del tamaño del cristalito, esto se debe a que el hábito plaquetario del mineral óseo se pierde, es decir, cuando el mineral interactuaba con el colágeno [29]. Así pues, al haber reducción del FWHM se asume que empieza la formación de los cristales de hidroxiapatita, dando paso al crecimiento en los tamaños del cristalito. En las temperaturas de 800°C y 1000°C se encuentra que existe estabilización de crecimiento del cristalito, así mismo, en las muestras relativas a estas temperaturas se encontró un pico en $37,3^\circ$ el cual es normalmente asociado a CaO y constituye una impureza indeseable en la HAp [104].

Además, se encontró los parámetros de red de la celda hexagonal unitaria $a=b=9.39 \pm 0.06 \text{ \AA}$ y $c=6.89 \pm 0.01 \text{ \AA}$ los cuales son muy cercanos a los presentados en la literatura [15], [103], [107]. Del mismo modo, se observa gracias a dichos valores que el tamaño de la celda de la estructura no es afectado por el cambio de temperatura. Dicha estabilidad puede asociarse por la presencia de impurezas como Mg, Na y CO_3^{2-} [5]. Así mismo, gracias a los patrones de difracción es posible observar, adicional a la HAp, componentes formados en los procesos de calcinación, tales como MgO, $\text{Ca}_4(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ [14].

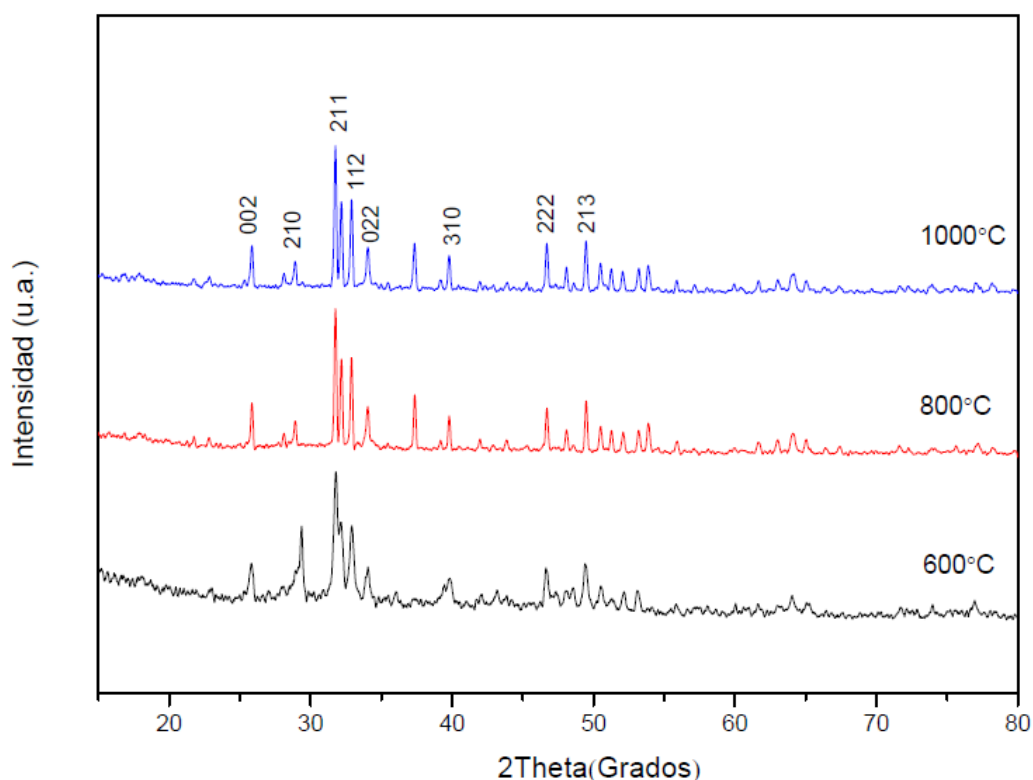


Figura 13. Difractogramas del polvo de hueso de ovino sometido a temperaturas de 600°C, 800°C y 1000°C.

4.5 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier FT-IR

En la figura 14 es posible observar los espectros infrarrojos de las muestras sometidas a las temperaturas de 600°C, 800°C y 1000°C, donde se aprecian las bandas de vibración correspondientes a los grupos funcionales característicos para la hidroxiapatita, es decir, los fosfatos PO_4^{3-} y los hidroxilos OH^- . Sin embargo, en las líneas espectrales también se evidencia la presencia de la vibración del grupo carbonato CO_3^{2-} , estas bandas ubicadas 1415cm^{-1} a y 875cm^{-1} están asociadas al estiramiento simétrico ν_3 y asimétrico ν_2 respectivamente [43]. Las cuales son propias de la sustitución de CO_3^{2-} por PO_4^{3-} en la estructura de la HAp, lo que da paso a la hidroxiapatita carbonatada, esta sustitución es típica en los huesos humanos propiciando una excelente biocompatibilidad y osteoconductividad [108]. Adicionalmente, los picos cercanos a 1620 , 1320 y 782 cm^{-1} en la gráfica de color verde (sin someter a calcinación), pueden atribuirse a la presencia agua y materia orgánica en la muestra antes de ser sometida a temperatura [32]. Así mismo, los cambios en la banda cercana a 1000 cm^{-1} son asociados con el decremento

de carbonatos lo cual se relaciona con el aumento de la cristalinidad [108], cabe resaltar que la presencia de los grupos carbonatos tiene origen en la fuente natural de la obtención de la HAp.

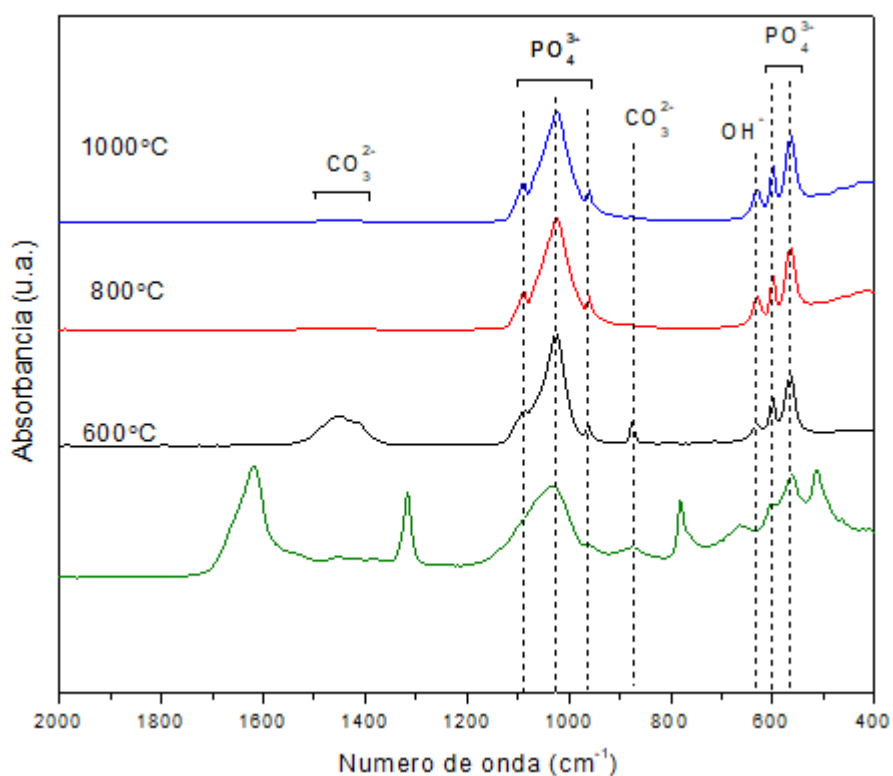


Figura 14. Espectros infrarrojos del polvo de hueso de ovino sin ser sometido a temperatura y sometido a 600°C, 800°C y 1000°C.

Capítulo 5: Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que la temperatura de calcinación influye en los cambios de las propiedades de las muestras de polvo de hueso ovino. Con el aumento de la temperatura se encuentran formas más cercanas a la hidroxiapatita estequiométrica, grados de cristalinidad más altos y tamaños de cristalitos superiores. También, para temperaturas de 600°C se observa una pérdida total del agua y materia orgánica de la muestra, superior a esta se da pérdida de carbonatos, esto es evidenciable en los espectros FT-IR, lo que sumado a los resultados en ATG lleva a sugerir que 760°C es una temperatura prudente para obtener muestras libres de proteínas para el caso de las muestras obtenidas. Además, se detectaron en los difractogramas presencia de CaO, lo que ratifica que las muestras obtenidas a 800°C y 1000°C tengan riqueza en Ca, debido a que su relación Ca/P es más alta que la HAp pura, siendo la relación más cercana a esta la muestra de 800°C con un valor de 1.76. Así mismo, la reducción del ancho medio de los picos en DRX representa un aumento en la formación de cristales y en el tamaño de estos, se encuentra que esto ocurre a medida que aumenta la temperatura de calcinación y, es posible evidenciarlo en las muestras de SEM, donde con dicho aumento se incrementa la formación de granos gracias al fenómeno de coalescencia, es decir que esta temperatura suministra energía para la formación de cristalitos, cabe resaltar que la disminución del FWHM no está necesariamente ligado a la calidad de estos [32]. Ahora bien, los parámetros de red de la estructura cristalina no presentan mayores variaciones con la temperatura, es factible asociarlo con la presencia de impurezas como los carbonatos a razón de que el material de estudio proviene de fuente biogénica. Por otro lado, hay que resaltar que existe necesidad en la calcinación de las muestras cuando estas provienen de fuentes animales, ya que como se mencionó a temperaturas inferiores a 600°C la muestra se considera amorfa, en este mismo sentido para futuros estudios sería prudente tomar valores intermedios de las temperaturas de calcinación que en este trabajo han sido tomadas, pues para los valores como la relación Ca/P se producen cambios considerables entre estas. Finalmente, con los resultados obtenidos las muestras calcinadas a 800°C se consideran prometedoras para estudios de biocompatibilidad.

Bibliografía

- [1] P. Hardouin, "Les biomatériaux de l'appareil locomoteur," *Rev Rhum Mal Ostéoartic*, vol. 59, pp. 829–833, 1992.
- [2] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. San Diego, California, USA, 2004.
- [3] S. Lazic, S. Zec, N. Miljevic, and S. Milonjic, "The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid," *Thermochimica*, vol. 374, pp. 13–22, 2001.
- [4] J. R.-G. M. Grarcia-Garduño, "La hidroxiapatita, su Importancia en los Tejidos Mineralizados y su aplicación," *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9(2), pp. 90–95, 2006.
- [5] P. Forero, "Influencia de la Temperatura en Hidroxiapatita Extraída a Partir de Hueso de Cerdo," Manizales, 2017.
- [6] A. M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, and T. Panz, "Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones," *Microchim*, vol. 161, 2008.
- [7] L. F. Lozano *et al.*, "Thermal analysis study of human bone, Journal of Materials Science," vol. 38, pp. 4777–4782, 2003.
- [8] B. O. Ratner, A. S. Hoffman, S. FJ, and L. JE, *An introduction to materials in Medicine*. San Diego: Academic Press, 1996.
- [9] M. Sadat-shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-khoshdargi, and A. Jamshidi, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures," *Acta Biomater.*, no. April, 2013.
- [10] M. Figueiredo, A. Fernando, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, and H. Figueiredo, "Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone," *Ceram. Int.*, vol. 36, no. 8, pp. 2383–2393, 2010.
- [11] A. L. Giraldo-betancur, D. G. Espinosa-arbelaez, A. Real-lópez, and B. M. Millan-malo, "Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 7, pp. 1383–1390, 2013.
- [12] C. F. Ramirez-gutierrez, S. M. Londoño-restrepo, A. Real, and M. A. Mondragón, "Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. March, pp. 7552–7559, 2017.
- [13] A. Taubert *et al.*, "Water-soluble cellulose derivatives are sustainable additives for biomimetic calcium phosphate mineralization," *Inorganics*, vol. 4, no. 4, 2016.
- [14] M. E. R.-G. s. M. Londoño, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, "The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. Journal of, pp. 29–52, 2018.

- [15] S. M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, A. Real-lópez, and M. E. Rodríguez-garcía, "In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, no. March, p. 110020, 2019.
- [16] Ž. Miti *et al.*, "Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue : A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 930–949, 2017.
- [17] S. T. D. Ellingham, T. J. U. Thompson, and M. Islam, "Thermogravimetric analysis of property changes and weight loss in incinerated bone," *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, vol. 438, pp. 239–244, 2015.
- [18] M. M. Stevens, "Biomaterials for bone tissue engineering (Review)," *Mater today*, vol. 11, pp. 18–25, 2008.
- [19] D. S. R. Krishna, C. K. Chaitanya, S. K. Seshadri, and T. S. S. Kumar, "Fluorinated hydroxyapatite by hydrolysis under microwave irradiation," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 16, pp. 15–17, 2002.
- [20] J. Rajendran, S. Gialanella, and P. B. Aswath, "XANES analysis of dried and calcined bones," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 7, pp. 3968–3979, 2013.
- [21] T. C. Schumacher *et al.*, "A novel , hydroxyapatite-based screw-like device for anterior cruciate ligament (ACL) reconstructions," *Knee*, p. 7, 2017.
- [22] N. Akyurt, M. Yetmez, U. Karacayli, and O. Gunduz, "A New Natural Biomaterial : Sheep Dentine Derived Hydroxyapatite," *Key Eng. Mater.*, vol. 494, pp. 281–286, 2012.
- [23] L. Duta *et al.*, "Comparative physical, chemical and biological assessment of simple and titanium-doped ovine dentine-derived hydroxyapatite coatings fabricated by pulsed laser deposition," *Appl. Surf. Sci.*, 2017.
- [24] B. Ben-Nissan, A. H. Choi, R. Roest, B. A. Latella, and A. Bendavid, "Adhesion of hydroxyapatite on titanium medical implants," *Hydroxyapatite Biomed. Apl.*, pp. 21–51, 2015.
- [25] A. J. Salinas and M. Vallet-Regí, "Adsorption and desorption of bioactive proteins on hydroxyapatite for protein delivery systems," *RSC Adv.*, no. 28, 2013.
- [26] S. Choi, X. Yu, L. Jongpaiboonkit, S. J. Hollister, and W. L. Murphy, "Inorganic coatings for optimized non-viral transfection of stem cells," *Sci. Rep.*, vol. 3, 2013.
- [27] C. Kojima and K. Watanabe, "Adsorption and Desorption of Bioactive Proteins on Hydroxyapatite for Protein Delivery Systems," *J. Drug Deliv.*, vol. 2012, p. 4, 2012.
- [28] A. Heredia, I. De F, I. De F, and C. De F, "Thermal analysis study of human bone," *Mater. Sci.*, vol. 38, pp. 4777–4782, 2003.
- [29] M. R. Mucalo, *Animal-bone derived hydroxyapatite in biomedical applications*. Elsevier Ltd., 2015.
- [30] L. González-Rodríguez, M. López-Álvarez, S. Astray, E. L. Solla, J. Serra, and P. González, "Hydroxyapatite scaffolds derived from deer antler: Structure

dependence on processing temperature,” *Mater. Charact.*, vol. 155, 2019.

- [31] C. F. Ramirez-gutierrez, S. M. London, and E. Rubio-rosas, “Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air,” *Mater. Sci.*, vol. 51, pp. 4431–4441, 2016.
- [32] S. M. Londoño-Restrepo, L. F. Zubieta-Otero, R. Jeronimo-Cruz, M. A. Mondragon, and M. E. Rodriguez-García, “Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 50, no. 8, pp. 1120–1129, 2019.
- [33] M. Boutinguiza, J. Pou, R. Comesaña, F. Lusquiños, A. De Carlos, and B. León, “Biological hydroxyapatite obtained from fish bones,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 3, pp. 478–486, 2012.
- [34] L. Bernard, M. Freche, J. L. Lacout, and B. Biscans, “Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature influence of purity of the raw material,” *Powder Technol.*, vol. 103, pp. 19–25, 1999.
- [35] G. Kumar, S. Rajendran, G. Karunakaran, and D. Kuznetsov, “Green synthesis and antibacterial activity of hydroxyapatite nanorods for orthopedic applications,” *MRS Commun.*, pp. 1–6, 2017.
- [36] G. K. Lim, J. Wang, S. C. Ng, C. H. Chew, and L. M. Ganl, “Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 21, pp. 1433–1439, 1997.
- [37] S. Meejoo, W. Maneepprakorn, and P. Winotai, “Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating,” *Thermochim. Acta*, vol. 447, no. 1, pp. 115–120, 2006.
- [38] N. Kivrak and A. C. Tas, “Synthesis of Calcium Hydroxyapatite – Tricalcium Phosphate (HA – TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior,” *Am. Ceram. Soc.*, vol. 52, no. 190968, pp. 2245–2252, 1998.
- [39] K. Poovendran and K. S. Joseph Wilson, “Amalgamation and characterization of porous hydroxyapatite bio ceramics at two various temperatures,” *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 100, no. March, pp. 255–261, 2019.
- [40] K. A. Gosain *et al.*, “A 1-Year study of Osteoinduction in Hydroxyapatite-Derived Biomaterials in an Adult Sheep Model: Part I,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 109(2), pp. 619–630, 2002.
- [41] B. S. Moonga and D. W. Dempster, “Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption in vitro,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 453–457, 1995.
- [42] S. Kishi and M. Yamaguchi, “Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1225–1230, 1994.
- [43] B. León and J. A. Jansen, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer S. 2009.
- [44] L. G. Sequeda, J. M. Díaz, S. J. Gutiérrez, S. J. Perdomo, and O. L. Gómez, “Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo,” *Rev. Colomb. Ciencias*

Químico - Farm., vol. 41, no. 1, pp. 50–66, 2012.

- [45] B. Moreno-perez, Z. Matamoros-veloza, and J. C. Rendon-angeles, “Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite using hydrothermal process,” *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, pp. 1–15, 2019.
- [46] D. Shepherd, “Zinc-substituted hydroxyapatite for the inhibition of osteoporosis,” *Hydroxyapatite Biomed. Appl.*, pp. 107–126, 2015.
- [47] G. Meng, X. Wu, R. Yao, J. He, W. Yao, and F. Wu, “Effect of zinc substitution in hydroxyapatite coating on osteoblast and osteoclast differentiation under osteoblast/osteoclast co-culture,” *Regen. Biomater.*, vol. 6, no. 6, pp. 349–359, 2019.
- [48] M. Bohner, “Calcium orthophosphates in medicine : from ceramics to calcium phosphate cements,” *Int. J. Care Inj.*, 2000.
- [49] M. Kitano and M. Taneda, “Icing and Multilayering Technique of Injectable Hydroxyapatite Cement Paste for Cranial Base Reconstruction After Transsphenoidal Surgery: Technical Note,” *Oper. Neurosurg.*, vol. 61, no. 3, pp. E53–E54, 2007.
- [50] I. Raya, E. Mayasari, A. Yahya, M. Syahrul, and A. I. Latunra, “Shynthesis and Characterizations of Calcium Hydroxyapatite Derived from Crabs Shells (*Portunus pelagicus*) and Its Potency in Safeguard against to Dental Demineralizations,” *Int. J. Biomater.*, vol. 2015, 2015.
- [51] S. J. Magalí Duarte Chavéz, “Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio por el método sol-gel,” vol. 3, no. September. San Lorenzo, Paraguay, pp. 1–47, 2012.
- [52] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, and T. Jayaramudu, *Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications*. Elsevier Inc., 2015.
- [53] H. Qu, H. Fu, Z. Han, and Y. Sun, “Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 45, pp. 26252–26262, 2019.
- [54] E. Crubezy, B. Ludes, J. Poveda, J. Clayton, and D. Crouau-Roy, B Montagnon, “Identification of mycobacterium DNA in an Egyptian pott’s disease of 5,400 years old,” *C R Acad Sci III*, vol. 321, no. 11, pp. 941–951, 1998.
- [55] D. Williams, “Review: tissue_biomaterial interactions,” *J Mat Sci*, vol. 22, no. 10, p. 3421–3445., 1987.
- [56] M. Javaid and M. Kaartinen, “Mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering,” *Int Dent J Stud Res*, vol. 1, no. 3, p. 24–35., 2013.
- [57] A. Yoruc and B. Sener, “A roadmap of biomedical engineers and milestone+,” *Biomater. Prof. Kara S, Ed.*, vol. ., 2012.
- [58] J. Anderson, “Biological responses to materials,” *Annu Rev Mater Res*, vol. 31, pp. 81–110, 2001.
- [59] M. Vallet-Regí, “Ceramics for medical applications,” *J Chem Soc Dalt. Trans*, vol. 2, pp. 97–108, 2001.
- [60] G. Chandra and A. Pandey, “Biodegradable bone implants in orthopedic

applications : a review,” *Integr. Med. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 596–610, 2020.

- [61] V. Orlovskii, V. Komlev, and S. Barinov, “Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics,” *Inorg Mater*, vol. 38, p. 973–984., 2002.
- [62] T. Winkler, F. A. Sass, G. N. Duda, and K. Schmidt-Bleek, “A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge,” *Bone Jt. Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 232–243, 2018.
- [63] D. Sánchez-Molina, “Caracterización biomecánica del hueso de oveja,” Barcelona, 2016.
- [64] D. Carolina and L. Coy, “Obtención y caracterización de hidroxiapatita dopada con nanopartículas de zno con potenciales aplicaciones biomédicas.” 2016.
- [65] R. Karpinski, L. Jaworski, and P. Czubacka, “The structural and mechanical properties of bone,” *Technol Exploit Mech Eng*, vol. 3, no. 1, p. 43–50., 2017.
- [66] J. D. J. Black, “Bone structure : from cortical to calcium,” *Orthop. Trauma*, vol. 34, no. 3, pp. 113–119, 2020.
- [67] A. Szcze, L. Ho, and E. Chibowski, “Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications,” vol. 249, no. April, pp. 321–330, 2017.
- [68] S. Dorozhkin, “Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications,” *Ceram Int*, vol. 42, pp. 6529–6554, 2016.
- [69] J. Pino G., “Estudio nanométrico de biocompatibilidad y adhesividad celular a biomateriales utilizados en cirugía ortopédica,” 2008.
- [70] A. Haider, K. C. Gupta, and I.-K. Kang, “PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, p. 314, 2014.
- [71] M. Londoño López, A. Echevarría, and F. De La Calle, “Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas,” *Rev. EIA*, no. 5, pp. 109–118, 2006.
- [72] University of Liverpool, “Hydroxyapatite Ca₅(OH)(PO₄)₃,” *Chem Tube 3D*, 2020. [Online]. Available: <https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>.
- [73] J. L. Sturgeon and P. W. Brown, “Effects of carbonate on hydroxyapatite formed from CaHPO₄ and Ca₄(PO₄)₂O,” *Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, pp. 1787–1794, 2009.
- [74] E. De Maeyer, R. Verbeeck, and I. Y. Pieters, “Effect of K⁺ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of monetite,” *Inorg Chem*, vol. 35, pp. 857–863, 1996.
- [75] W. Shih, Y. Chen, M. Wang, and M. Hon, “Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from CaHPO₄ · 2H₂O and CaCO₃ by hydrolysis method,” *Cryst. Growth*, vol. 270, pp. 211–218, 2004.
- [76] K. Lin, X. Liu, J. Chang, and Y. Zhu, “Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles, nanowires and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard-precursors,” *Nanoscale*, vol. 3, pp. 3052–3055, 2011.

- [77] D. Tsiourvas, A. Tsetsekou, M. I. Kammenou, and N. Boukos, "Controlling the Formation of Hydroxyapatite Nanorods with Dendrimers," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 94, pp. 2023–2029, 2011.
- [78] H. S. Liu *et al.*, "Hydroxyapatite Synthesized by a Simplified Hydrothermal Method," *Ceram. Int.*, vol. 8842, no. 23, pp. 19–25, 1997.
- [79] J. Chen *et al.*, "Mater. Lett.," vol. 65, pp. 1923–1926, 2011.
- [80] A. Fihri, C. Len, R. S. Varma, and A. Solhy, "Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 347, pp. 48–76, 2017.
- [81] Y. Zhang and J. Lu, "Cryst. Growth," *Des.*, vol. 8, pp. 2101–2107, 2008.
- [82] C. Shum, A. Bandyopadhyay, S. Bose, and D. A. Weitz, "Chem. Mater.," vol. 21, pp. 5548–5555, 2009.
- [83] Y. ping Zhu, X. kui Wang, W. lin Guo, J. gang Wang, and C. Wang, "Sonochemical synthesis of silver nanorods by reduction of silver nitrate in aqueous solution," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 17, no. 4, pp. 675–679, 2010.
- [84] J. Alarcón, "Tema 2. Métodos de preparación de materiales cerámicos." p. 16, 2014.
- [85] M. Fathi and E. Mohammadi Zahrani, "Mechanical alloying synthesis and bioactivity evaluation of nanocrystalline fluoridated hydroxyapatite," *J. Cryst. Growth*, vol. 311, pp. 1392–1403, 2009.
- [86] S. Padmanabhan, L. Salvatore, F. Gervaso, M. Catalano, A. Taurino, and Sannino, "Synthesis and characterization of collagen scaffolds reinforced by eggshell derived hydroxyapatite for tissue engineering," *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 15, no. 1, pp. 504–513, 2015.
- [87] D. Milovac, G. Gallego Ferrer, M. Ivankobic, and H. Ivankovic, "PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity," *Mater Sci Eng C*, vol. 34, pp. 437–482, 2014.
- [88] H. Zhou and J. Lee, "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [89] P. Gabbott, *Principles and Applications of Thermal Analysis*, Blackwell. Oxford UK, 2008.
- [90] M. E. Brown, *Thermal Analysis and Calorimetry, Principles and Practice*, Elsevier S. Amsterdam, 1998.
- [91] N. Ignjatović, E. Suljovrujić, Z. Stojanović, and D. Uskoković, "Structure and characteristics of the hot pressed hydroxyapatite/poly-L-lactide composite," *Sci. Sinter*, vol. 34, pp. 79–93, 2002.
- [92] C. R. Galia, A. L. Lourenço, R. Rosito, and L. M. A. Q. Camargo, "Physicochemical characterization of lyophilized bovine bone grafts," *Rev. Bras. Ortop*, vol. 46, pp. 79–93, 2011.
- [93] L. Veselinović *et al.*, "Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing," *J. Appl.*

Crystallogr, vol. 43, pp. 320–327, 2010.

- [94] L. Kandić, M. Mitrić, N. Ignjatović, and D. P. Uskoković, “XRD analysis of calcium phosphate and biocomposite calcium phosphate/bioresorbable polymer,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 518, pp. 507–512, 2006.
- [95] N. Ignjatović, S. V. Djurić, Ž. Mitić, D. Janković, and D. Uskoković, “Investigating an organ-targeting platform based on hydroxyapatite nanoparticles using a novel in situ method of radioactive ¹²⁵Iodine labeling,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 439–446, 2014.
- [96] F. Bergaya, B. K. G. Theng, and G. Lagaly, *Handbook of Clay Science*, First. Amsterdam, The Netherlands, 2006.
- [97] J. Coates, “Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach,” pp. 1–23.
- [98] Chemistry LibreTexts, “Infrarrojo: Interpretación.” 2020.
- [99] S. Swapp, “Scanning Electron Microscopy (SEM), SERC.” p. Obtenido el 21 de Junio de 2020, de <https://serc.c>, 2017.
- [100] A. R. Clarke and C. N. Eberhardt, *Microscopy techniques for materials science*. 2002.
- [101] M. Ipohorski and P. Bozzano, “Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales,” *Cienc. Invest.*, vol. 63, pp. 43–53, 2013.
- [102] L. Reimer, *Scanning electron microscopy : physics of image formation and microanalysis.*, Springer. 1998.
- [103] S. Kumar, R. A. Jahan, S. Yee, X. Li, and M. T. Arafat, “Effects of organic modifiers and temperature on the synthesis of biomimetic carbonated hydroxyapatite,” vol. 45, no. May, pp. 24717–24726, 2019.
- [104] S. Ramesh, C. Y. Tan, M. Hamdi, I. Sopyan, and W. D. Teng, “The influence of Ca / P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics,” *Proc. SPIE*, vol. 6423, no. 03, pp. 1–6, 2007.
- [105] M. E. Fleet, X.-Y. Liu, and Y.-M. Pan, “Site preference of rare earth elements in hydroxyapatite Ca₁₀ (P O₄)₆ (O H)₂,” *J. Solid State Chem.*, vol. 149, pp. 391–398, 2000.
- [106] A. Z. Alshemary, M. Akram, Y. F. Goh, M. R. Abdul Kadir, A. Abdolahi, and R. Hussain, “Structural characterization, optical properties and in vitro bioactivity of mesoporous erbium-doped hydroxyapatite,” *J. Alloys Compd.*, vol. 645, pp. 478–486, 2015.
- [107] Q. Wang *et al.*, “Computer simulation of biomolecule-biomaterial interactions at surfaces and interfaces,” *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 3, p. 32001, 2015.
- [108] A. Sroka-Bartnicka, L. Borkowski, G. Ginalska, A. Ślósarczyk, and S. G. Kazarian, “Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 171, pp. 155–161, 2017.

